



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

PAULA ASHIKAWA HOJO

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE
PRÓPOLIS VERDE POR ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA**

**CAMPINAS
2017**

PAULA ASHIKAWA HOJO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE PRÓPOLIS VERDE POR ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Alimentos da Faculdade
de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Mestra em
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. MARCELO CRISTIANINI

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação
defendida pela aluna Paula Ashikawa Hojo e orientada pelo
Prof. Dr. Marcelo Cristianini.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

H689e Hojo, Paula Ashikawa, 1984-
Extração de compostos bioativos de própolis verde por alta pressão isostática / Paula Ashikawa Hojo. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marcelo Cristianini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Alta pressão isostática. 2. Propole. 3. Artepillin-C. 4. Flavonóides. 5. Compostos fenólicos. I. Cristianini, Marcelo, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Extraction of green propolis bioactive compounds by high pressure processing technology

Palavras-chave em inglês:

High isostatic pressure processing

Propolis

Artepillin-C

Flavonoids

Phenolic compounds

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Cristianini [Orientador]

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Mário Roberto Maróstica Junior

Data de defesa: 20-09-2017

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
(DTA – FEA – UNICAMP)

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya
(IB – UNICAMP)

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
(DEPAN – FEA – UNICAMP)

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTO

Passo a passo alcançamos esta conquista. Inúmeras pessoas, direta e significativamente ou com uma simples palavra ou ação, me ajudaram a concluir este projeto profissional e de vida.

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício que me encontrou “perdida” nos corredores do DTA procurando por orientações para cursar o mestrado enquanto eu trabalhava e me confortou, orientou e me encorajou a seguir em frente.

À Profa. Dra. Priscilla Efraim, Prof. Flávio Schmidt, Prof. Assis e Prof. Carlos Anjos, que muito me incentivaram e me aceitaram como aluna especial em suas disciplinas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Cristianini por tanto me apoiar e fazer realizar, desde a seleção até esta conquista, pela confiança, compreensão, amizade e orientação durante toda a jornada.

Aos meus colegas do laboratório LATEM: Aline, Ana Laura, Bruna, Bruno, Elisa, Franklin, Laura, Leandro, Miguel, Ricardo e Thiago pela amizade, auxílio nos processamentos e nas estatísticas, pelas conversas enriquecedoras e ajuda à distância. Cada um de vocês de alguma forma me incentivou a seguir em frente, em cada contato sentia que sempre podia contar com vocês e me fizeram não desanimar.

Aos técnicos Ana Maria e Zé Roberto pelas orientações e auxílios.

À secretaria de pós-graduação, em especial à Andrea, ao Cosme e à Camila, pelas orientações e toda a atenção.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos por me receberem e por todo o apoio prestado.

À UNICAMP pela oportunidade da graduação e do mestrado e por oferecer uma vivência acadêmica completa.

À diretora da MN Própolis, Ms. Andrea Harumi Matsuda, pelo ensinamentos, apoio e incentivo, ao presidente e ao diretor, Norihito Matsuda e Carlos Wada, pela

compreensão e flexibilização dos meus horários de trabalho e doação das matérias-primas e embalagens para a realização do projeto.

Às diretoras do Cetal, Ms. Adriana Hitomi Matsuda e Dra. Harko Matsuda pela disponibilidade de equipamentos e reagentes para as análises e de coordenadoras e analistas para me orientar nas atividades internas do laboratório, em especial: Flávia, Déborah, Cristiane, Lilian, Eliana, Mariana, Débora e Renata.

Ao Prof. Dr. Julian e ao Ms. Manuel Barrales pela disponibilidade do equipamento de ultrassom e de tempo, pelas orientações e contribuições para os processamentos.

À Profa. Dra. Alexandra, Profa. Dra. Beatriz, Prof. Dr. Mário e Prof. Dr. Julian pelas correções e contribuições para este trabalho.

A todos os meus amigos, em especial à Dra. Odete, Paula, Patty, Rosana e Tatiane por me confortarem, orientarem e me ouvirem.

Ao meu companheiro Amadeu, por me confortar, apoiar e auxiliar em todos os momentos.

Aos meus pais e irmãs, que me deram a base, abrigo e apoio.

Às minhas avós, tios(as) e primos que sempre se interessaram e se orgulharam das minhas conquistas.

A Deus, pela minha saúde e por me conduzir.

RESUMO

A própolis, especialmente a brasileira, é mundialmente conhecida por suas propriedades antioxidantes, devido à presença de compostos fenólicos em sua composição. Entretanto, a própolis “in natura” ou bruta não pode ser consumida diretamente, sendo necessário o uso de solvente orgânico para a extração dos seus compostos bioativos. O método de extração mais conhecido e comumente utilizado é a maceração em solução etanólica, que demanda um longo período de tempo para que o extrato atinja os teores de compostos desejados. A tecnologia de alta pressão isostática apresenta-se como um método promissor para a extração de compostos bioativos de alimentos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da alta pressão isostática, assim como do tempo, temperatura e relação sólido: solvente no processamento de extrato da própolis brasileira, proveniente do alecrim-do campo (*Baccharis dracunculifolia*), também conhecida como própolis verde. Os resultados demonstraram que 1 minuto no equipamento de alta pressão isostática sob pressão de 25 MPa foi suficiente para obter extratos com compostos bioativos (25,25 mg/mL de compostos fenólicos totais, 10,05 mg/mL de compostos flavonoides totais e 1,12% de Artepelin-C) no mesmo teor a partir de 4 horas de maceração com agitação a 100 rpm e 5 dias por maceração estática nas mesmas condições de temperatura e relação sólido: solvente (40 °C, relação 1:3 m/m). As amostras também foram processadas pela tecnologia de extração assistida por ultrassom, que também se mostrou mais eficiente que os métodos tradicionais de maceração, obtendo-se extratos com 10,88 mg/mL de compostos flavonoides totais, 25,52 mg/mL de compostos fenólicos totais e 1,30% de Artepelin-C), nas condições de 480 W de potência, 20 kHz por 40 minutos.

ABSTRACT

Propolis, especially Brazilian propolis, is known worldwide for its antioxidant properties due to the presence of phenolic compounds in its composition. However, natural or crude propolis can not be consumed directly, it is necessary to use organic solvents for the extraction of the bioactive compounds. The most commonly used extraction method is maceration in ethanolic solution, which requires a long period of time for the extract to reach the desired levels of compounds. High-pressure isostatic technology presents itself as a promising alternative method for extracting bioactive compounds from food. The objective of this study was to evaluate the effect of the high isostatic pressure, with variation of time, temperature and solid: solvent ratio to process Brazilian propolis extract, obtained from *Baccharis dracunculifolia* resin, known as green propolis. The results showed that 1 minute in the high pressure isostatic equipment at 25 MPa was sufficient to obtain propolis extracts with bioactive compounds (containing 25,25 mg/mL of phenolic compounds, 10,05 mg/mL of total flavonoid compounds and 1,12% of Artepillin-C). The same levels were only obtained by maceration after 4 hours with stirring at 100 rpm or after 5 days by static maceration under the same conditions of temperature and solid: solvent ratio (40° C, ratio 1:3 m/m). The samples were also processed by ultrasound assisted extraction technology which was also more efficient than conventional extraction methods, obtaining extracts with 10.88 mg/mL of total flavonoids, 25.52 mg/mL of total phenolic compounds and 1.30% of Artepillin-C), in the conditions of 480 W of power, 20 kHz for 40 minutes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A) Processamento Própolis e B) Própolis Bruta Verde	23
Figura 2: Coleta de Resina da <i>Baccharis dracunculifolia</i>	24
Figura 3: Faturamento (milhões de dólares) de própolis exportada	28
Figura 4: Quantidade (toneladas) de própolis brasileira exportada	29
Figura 5: Estrutura Química do Artepellin-C	32
Figura 6: Equipamento de Alta Pressão Isostática	51
Figura 7: Unidade de Ultrassom	51
Figura 8: Complexação Flavonoide-Alumínio	57
Figura 9: Flavonoides totais (mg/mL) dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.	64
Figura 10: Compostos fenólicos totais (mg/mL) dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.	65
Figura 11: Artepellin-C (%) dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.	65

Figura 12: Teores de Compostos Bioativos (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se o tempo, submetido à pressão de 25 MPa a 40 °C e relação sólido solvente 1:2 (m/m). Letras em azul representam a análise estatística entre os processamentos para flavonoides totais, letras em vermelho para compostos fenólicos totais e em preto para Artepelin-C.....67

Figura 13: Compostos Bioativos (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se a temperatura em processamento por alta pressão isostática a 25 MPa por 1 minuto. Letras em azul representam a análise estatística entre os processamentos para flavonoides totais, letras em vermelho para compostos fenólicos totais e em preto para Artepelin-C.....68

Figura 14: Compostos Bioativos (mg/g) dos extratos obtidos variando-se a razão sólido: solvente (1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 m/m) sob pressão de 25 MPa, tempo de 60 segundos e temperatura de 40 °C. Letras em azul representam a análise estatística entre os processamentos para flavonoides totais, letras em vermelho para compostos fenólicos totais e em preto para Artepelin-C.....70

Figura 15: Comparação da extração de flavonoides totais (mg/mL) obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.72

Figura 16: Comparação da extração de compostos fenólicos totais (mg/mL) obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática. 72

Figura 17: Comparação da extração de Artepelin-C (%) obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam

que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.73

Figura 18: Flavonoides Totais dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes potências por ultrassom. ...76

Figura 19: Compostos Fenólicos Totais dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes potências por ultrassom. ...76

Figura 20: Artepelin-C dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes potências por ultrassom. ...77

Figura 21: Flavonoides Totais dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom.78

Figura 22: Compostos Fenólicos Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom.80

Figura 23: Artepelin-C (%) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom.81

Figura 24: Curva de Calibração para Flavonoides Totais 101

Figura 25: Curva de Calibração – Compostos Fenólicos Totais 102

Figura 26: Curva de Calibração – Artepelin-C 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da Própolis Brasileira	25
Tabela 2: Especificações para Própolis	26
Tabela 3: Especificações para Extrato de Própolis.....	27
Tabela 4: Comparativo da Extração de Compostos Bioativos nas condições de extração de maior eficiência das tecnologias	83
Tabela 5: Flavonoides Totais extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m). 104	
Tabela 6: Compostos Fenólicos Totais dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m).....	105
Tabela 7: Artepelin-C (%) dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m). 106	
Tabela 8: Flavonoides Totais (mg/mL) dos extratos obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m).....	107
Tabela 9: Compostos Fenólicos Totais (mg/mL) dos extratos obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)	108
Tabela 10: Artepelin-C dos extratos obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m).....	109

Tabela 11: Flavonoides Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)..... 110

Tabela 12: Compostos Fenólicos Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m) 111

Tabela 13: Artepelin-C (%) dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m) 112

Tabela 14: Flavonoides Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)..... 113

Tabela 15: Compostos Fenólicos Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m) 114

Tabela 16: Artepelin-C (%) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)..... 115

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	18
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	Própolis	21
3.1.1	Origem e Classificação	21
3.1.2	Mercado.....	27
3.1.3	Composição	30
3.1.4	Efeitos.....	32
3.1.5	Tecnologia de Extração	34
3.2	Alta Pressão Isostática.....	39
3.2.1	Efeito da Alta Pressão na Extração de Compostos Bioativos.....	40
3.3	Uso tecnológico do Ultrassom.....	43
3.3.1	Efeito do Ultrassom na Extração de Compostos	45
4.	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Material.....	49
4.1.1	Matérias-Primas.....	49
4.1.2	Embalagens.....	50
4.1.3	Equipamento de Alta Pressão Isostática	50

4.1.4 Equipamento de Ultrassom.....	51
4.1.5 Padrões e Reagentes	52
4.2 Métodos	52
4.2.1 Preparo da matéria-prima para análises.....	52
4.2.2 Extração dos Compostos Bioativos da Própolis Verde por Alta Pressão	54
4.2.3 Extração dos Compostos Bioativos da Própolis Verde por Maceração	55
4.2.4 Extração de Compostos Bioativos da Própolis Verde por Ultrassom	56
4.2.5 Análises dos Compostos Bioativos.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Caracterização Química da Matéria-Prima.....	61
5.1.1 Teor de Umidade	61
5.1.2 Flavonoides Totais.....	61
5.1.3 Compostos Fenólicos Totais.....	62
5.1.4 Artepelin-C	63
5.2 Extração em Alta Pressão.....	63
5.2.1 Análise de Flavonoides Totais, Compostos Fenólicos Totais e Artepelin-C dos Extratos Obtidos por Alta Pressão	63
5.3 Cinética da Extração Convencional – estática e com agitação	71
5.4 Extração por Ultrassom.....	75
6. CONCLUSÃO	85
7. REFERÊNCIAS	86

ANEXOS.....	101
-------------	-----

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os produtos apícolas despertam grande interesse da comunidade científica e de profissionais da saúde por comporem uma categoria limítrofe entre alimento e medicamento, se estabelecendo como alimentos funcionais (MATSUDA, 1994). Dentre os produtos da colmeia, a própolis destaca-se por suas propriedades: terapêuticas, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica e anticariogênica (PARK *et al.*, 1998). De acordo com Brasil (2001), a própolis é elaborada a partir do material resinoso, gomoso e balsâmico coletado dos vegetais pelas abelhas, modificado pela adição das secreções salivares das abelhas, cera e pólen.

A própolis contém compostos bioativos caracterizados e estudados internacionalmente. A própolis verde, característica do sudeste do Brasil, é a única conhecida por conter o ácido fenólico Artepellin-C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), cuja fonte vegetal é o alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) (MARÓSTICA JÚNIOR *et al.*, 2008; ALENCAR *et al.*, 2005; PARK, ALENCAR & AGUIAR, 2002; PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000). A solubilidade e extração destes compostos são seletivas e por ser um material resinoso e com alto teor de cera, não é aconselhável o consumo em sua forma *in natura*. Sendo assim, a forma mais comum para o consumo de própolis é como extrato; segundo Malaspina e Palma (2000), o solvente utilizado comercialmente para a produção de extratos é o etanol, através da maceração convencional.

De acordo com Shouqin, Junjie e Changzen (2004), através do processamento por alta pressão isostática a extração de determinados compostos em alimentos é acelerada, especialmente na extração de compostos bioativos. Este processo tem como vantagem a preservação de micronutrientes que comumente são degradados em processos térmicos convencionais, além de preservar características organolépticas e o valor nutricional do produto (CAMPOS, DOSUALDO E CRISTIANINI, 2003).

Avaliando o potencial de aumento de demanda de extrato de própolis devido às suas propriedades antioxidantes, o reconhecimento da particularidade da própolis brasileira internacionalmente e a valorização comercial deste produto, este trabalho visou ao estudo da tecnologia da alta pressão isostática como alternativa aos métodos convencionais de extração e avaliação dos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e Artepelin-C dos produtos resultantes obtidos por esta tecnologia.

Para o estudo, foram avaliados os efeitos dos parâmetros: pressão (MPa), temperatura (°C), tempo de processo (minutos) e relação sólido: solvente (massa/massa) no processamento das amostras para a extração de flavonoides, compostos fenólicos totais e Artepelin-C. Foi realizada a comparação da extração por alta pressão isostática com as tecnologias de maceração estática, de maceração por agitação e tecnologia de extração assistida por ultrassom.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do processamento por tecnologia de alta pressão isostática na extração de compostos bioativos da própolis verde em comparação a outros métodos de extração.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da variação da pressão, da temperatura, do tempo e da relação sólido: solvente na própolis submetida à alta pressão isostática para extração de flavonoides totais, compostos fenólicos e Artepelin-C e definir as melhores condições de processo para esta tecnologia;
- Utilizar os mesmos parâmetros para processamento em pressão atmosférica e avaliar a cinética de extração em maceração convencional (estática) e por agitação;
- Avaliar a extração de própolis verde assistida por ultrassom.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Própolis

3.1.1 Origem e Classificação

O nome própolis é derivado das palavras gregas: “pro” (em defesa) e “polis” (cidade), ou seja, em defesa da cidade ou da colmeia. As abelhas usam este produto para protegerem-se de insetos e micro-organismos, empregando-o para fechar frestas e cavidades e no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha. É também utilizada para embalsamar insetos invasores, evitando desta forma a decomposição desses organismos que acarretariam no crescimento de micro-organismos prejudiciais à colmeia, além de manter a temperatura estável dentro das colmeias (MARCUCCI, 1996).

Os primeiros estudos sobre a origem botânica da própolis datam do início do século XX, que mostraram que as abelhas coletam resinas de ramos, folhas, botões de bétula, humos e plantas contendo bálsamo. Atualmente, sabe-se que a própolis é formada a partir de produtos do metabolismo das abelhas (ceras), de resinas de plantas, de materiais que foram introduzidos durante a elaboração da própolis e substâncias coletadas que sofreram algum tipo de modificação na sua estrutura por alguma enzima presente na saliva das abelhas (MATSUDA, 2002).

De acordo com Cattorini (1953), gemas das plantas que se desenvolvem nos ramos atraem as abelhas coletoras que rompem pedaços de resinas, usando as pernas posteriores e as peças bucais. Essas resinas são umedecidas com a língua, formando pequenas esferas pelas mandíbulas. Essas esferas são transferidas da mandíbula para a corbícula, que é uma parte externa posterior da tíbia. Quando a corbícula está totalmente tomada, as abelhas finalmente depositam a resina na colmeia.

A Figura 1 mostra como a própolis é produzida pelas abelhas e a coleta pelo homem, o produto (própolis bruta/*in natura*) e os produtos processados cuja matéria-prima é a própolis.





B)

Figura 1: A) Processamento Própolis e B) Própolis Bruta Verde
Fonte: MN Própolis (2016)

Os apicultores em geral utilizam o método de caixas, nas quais são feitas frestas nas aberturas laterais das melgueiras e inseridos os quadros coletores. Estas frestas são preenchidas com própolis pelas abelhas, sendo retiradas com espéculo ou faca pelos apicultores quando totalmente preenchidas (EMBRAPA, 2010).

A coloração da própolis, dependendo de sua procedência, varia de marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até ao marrom avermelhado. Possui um odor que pode variar de uma amostra para outra. O sabor é característico, variando de suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica. O ponto de fusão varia entre 60-70 °C e pode atingir até 100 °C. A própolis é uma substância de consistência rígida à temperatura de aproximadamente 15 °C, tornando-se maleável a partir de 30 °C. Alguns solventes, tais como: éter, etanol, acetona e tolueno permitem a solubilização de muitos constituintes. A parte insolúvel é constituída de matéria orgânica, tecidos vegetais e outros. Os compostos solúveis da própolis são constituídos por materiais cerosos, bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (MARCUCCI, 1995). Tradicionalmente, considera-se que a própolis contém: 50 a 60% de resinas e bálsamos, 30 a 40% de ceras, 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen e o restante da composição com pequenas quantidades de alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e vitaminas C, E e do complexo B (GHISALBERTI, 1979).

Em países de clima temperado da Europa e América do Norte, os vegetais produtores da resina para produção de própolis são poucos. O choupo, *Populus L.*, é a principal fonte. Ainda pode-se encontrar esta espécie vegetal na Ásia e no norte da África. No Brasil, a própolis é produzida por toda a extensão do território, porém sua caracterização e qualidade varia de uma região para outra devido à diversidade climática e de vegetação. Assim, a própolis proveniente de cada região apresenta diferentes compostos fenólicos em sua composição (MARCUCCI et al., 1998). Há diversas espécies vegetais para a retirada de resina, porém, poucas foram as espécies identificadas até agora, sendo o assa-peixe (*Vernonia polyanthes Less.*), a aroeira (*Schinus terebinthifolius raddi*), o alecrim (*Baccharis spp.*) e o eucalipto (*Eucaliptus spp*) alguns exemplos de vegetais dos quais as abelhas buscam a matéria-prima para a produção da própolis (PARK, IKEGAKI E ALENCAR, 2000). Bankova et al (1999) cita ainda como fonte vegetal coletada pelas abelhas para produzir própolis a *Araucária angustifolia* (pinheiro brasileiro).

A Figura 2 representa a abelha coletando resina de *Baccharis dracunculifolia*, que dá origem à própolis verde.



Figura 2: Coleta de Resina da *Baccharis dracunculifolia*
Fonte: MN Própolis (2016)

Sendo a própolis um produto natural, resultante da extração de resinas de plantas e do trabalho das abelhas, sua composição química é muito variada e

complexa e está relacionada à vegetação de cada região. Alguns estudos, como de Matsuda (2008), relacionam e comparam análises de própolis de diferentes regiões.

Para facilitar a classificação da própolis brasileira foi realizada a divisão em 13 grupos de diferentes tipos de própolis, de acordo com sua origem botânica e propriedades biológicas, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação da Própolis Brasileira

Grupos	Origem da Própolis Bruta	Cor do Extrato Etanólico	Referência
1 (RS5)	Região Sul	Amarelo	Park et al. (2000).
2 (RS1)	Região Sul	Castanho Claro	Park et al. (2000).
3 (PR7)	Região Sul	Castanho Escuro	Park et al. (2000).
4 (PR8)	Região Sul	Castanho Claro	Park et al. (2000).
5 (PR9)	Região Sul	Marrom Esverdeado	Park et al. (2000).
6 (BA11)	Região Nordeste	Marrom Avermelhado	Park et al. (2000).
7 (BA51)	Região Nordeste	Marrom Esverdeado	Park et al. (2000).
8 (PE5)	Região Nordeste	Castanho Escuro	Park et al. (2000).
9 (PE3)	Região Nordeste	Amarelo	Park et al. (2000).
10 (CE3)	Região Nordeste	Amarelo Escuro	Park et al. (2000).
11 (P11)	Região Nordeste	Amarelo	Park et al. (2000).
12 (SP12)	Região Sudeste	Verde ou Marrom Esverdeado	Park et al. (2000).
13	Região Nordeste	Vermelha	Daugusch et al. (2006).

Com a criação da classificação em grupos, PARK, ALENCAR e AGUIAR (2000) analisaram os extratos de própolis obtidos a partir das própolis dos grupos 1 ao 12 quanto às substâncias solúveis, zona de inibição contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, atividade anti-inflamatória e antioxidante. Os estudiosos concluíram que a própolis que tem maior atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* é a do grupo 12, porém a mesma não atua da mesma forma sobre *Streptococcus mutans*, sendo a própolis do grupo 3 a que age melhor contra este último micro-organismo. As própolis dos grupos 1, 9, 10 ou 11 praticamente não apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Com relação à atividade antioxidante, todas apresentaram atividade maior que 80%, exceto as dos grupos 9 e 10. Quanto à atividade anti-inflamatória, as

amostras dos grupos 3, 5, 6, 7, 8 e 12 foram as que apresentaram maior atividade quando comparadas com os grupos 1, 2, 4, 9, 10 e 11

Park, Ikegaki e Alencar (2000) relataram que a própolis proveniente do sudeste brasileiro possui maiores atividades antimicrobiana e anti-inflamatória em comparação com própolis de outras regiões do Brasil. A própolis verde brasileira é classificada como pertencente ao grupo 12, sendo a mais comercializada e largamente utilizada em alimentos e bebidas para prevenção de doenças e manutenção da saúde.

Os padrões de identidade e qualidade da Própolis e do Extrato de Própolis são regulamentados pela INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, DE 19 DE JANEIRO DE 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001). A Tabela 2 apresenta os requisitos para Própolis e a Tabela 3 para o Extrato de Própolis.

Tabela 2: Especificações para Própolis

Requisito	Especificação
Aroma	Característico (balsâmico e resinoso) dependendo da origem botânica
Cor	Amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, variando conforme a origem botânica
Sabor	Característico de suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica
Consistência	Maleável a rígida, dependendo da origem botânica
Granulometria	Heterogênea
Perda por Dessecação	Máximo 8% (m/m)
Cinzas	Máximo 5% (m/m)
Cera	Máximo 25% (m/m)
Compostos Fenólicos	Mínimo 5% (m/m)
Flavonoides	Mínimo 0,5% (m/m)
Atividade de Oxidação	Máximo de 22 s
Massa Mecânica	Máximo 40% (m/m)
Solúveis em Etanol	Mínimo 35% (m/m)

Fonte: BRASIL (2001)

Tabela 3: Especificações para Extrato de Própolis

Requisito	Especificação
Aroma	Característico (balsâmico e resinoso) dependendo da origem botânica
Cor	Âmbar, avermelhada ou esverdeada, variando conforme a origem botânica e concentração
Sabor	Característico de suave balsâmico a forte, amargo e picante
Aspecto	Líquido límpido e homogêneo
Extrato Seco	Mínimo de 11% (m/m)
Cera	Máximo 1% do extrato seco (m/m)
Metanol	Máximo 0,40 mg/L
Teor Alcoólico	Máximo 70%
Compostos Fenólicos	Mínimo 0,5% (m/m)
Flavonoides	Mínimo 0,25% (m/m)
Atividade de Oxidação	Máximo de 22 s
Massa Mecânica Solúveis em Etanol	Máximo 40% (m/m) Mínimo 35% (m/m)

Fonte: BRASIL (2001)

3.1.2 Mercado

A própolis brasileira que apresenta maior aceitação no mercado internacional é a de cor verde, com aroma suave, textura consistente e predominância de alecrim do campo (*Baccharis spp.*). A própolis brasileira tem sido usada como ingrediente em alimentos funcionais, principalmente no Japão, nos Estados Unidos e na Europa. São rotuladas como um produto único ("Brazilian propolis") e a grande procura tem se dado em função da presença do composto fenólico Artepelin-C (PAREDES-GUZMÁN et

al., 2003). O preço da própolis varia de acordo com a qualidade. No Brasil, a maior parte da produção é exportada (BRASIL, 2016).

Segundo Lima et al. (2006), cada colmeia pode produzir, por ano, 20 kg de mel e 1,2 kg de própolis. O alto valor agregado da própolis também se deve ao baixo rendimento na produção apícola.

Durante o período de Janeiro a Junho de 2016, os países compradores de própolis do Brasil, em ordem decrescente de quantidade comprada, foram: Japão, China, EUA, Canadá, Coreia do Sul, Taiwan, França, Malásia, Tailândia, Cingapura, Espanha, Hong Kong, Bélgica, Israel, Nova Zelândia, Vietnã, Arábia Saudita, Suíça, Chile e Austrália, sendo que o preço variou de US\$ 50,80 a US\$ 246,80 por quilo (BRASIL, 2016). A figura 3 mostra o faturamento (milhões de dólares) de própolis brasileira exportada no período de 2010 até Junho de 2016 e a figura 4 a quantidade (toneladas) neste mesmo período.

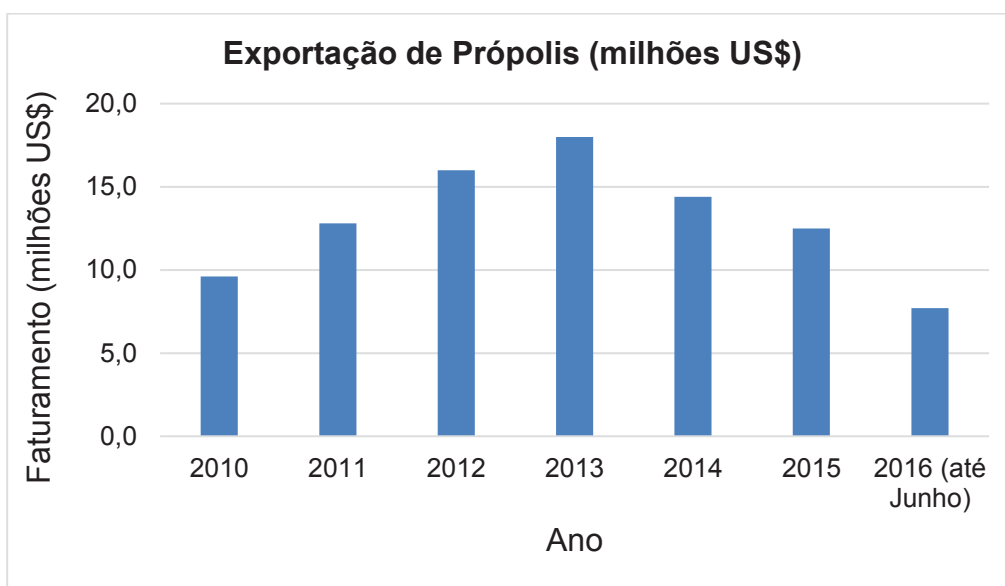


Figura 3: Faturamento (milhões de dólares) de própolis exportada

Fonte: Brasil (2016). Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.

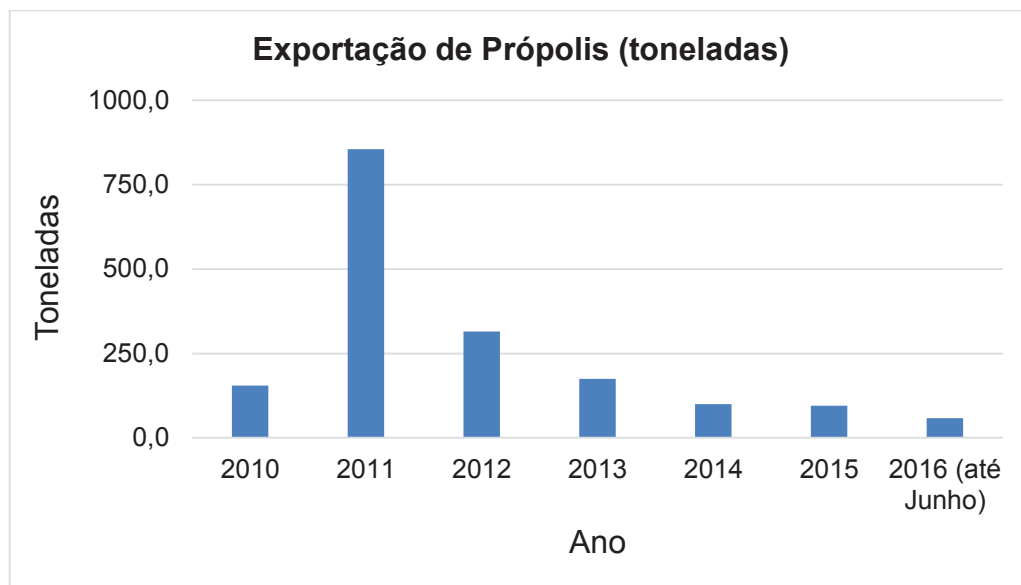


Figura 4: Quantidade (toneladas) de própolis brasileira exportada
Fonte: Brasil (2016). Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.

Observa-se através da figura 4 que entre os anos de 2011 e 2013, houve uma brusca queda da quantidade em toneladas de própolis exportada; em contrapartida, no mesmo período, aumento do faturamento da quantidade exportada, o que demonstra que o valor agregado por quilo de própolis vem aumentando.

Das formas de comercialização da própolis o extrato é a que apresenta maior potencial no Brasil, devido à facilidade e praticidade de consumo e é o único produto consumível derivado de própolis aprovado para comercialização no mercado nacional como alimento pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001). Produtos em cápsula e/ou comprimidos são liberados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária como opoterápicos, requerindo assim, registro como medicamento (ANVISA, 2003). Apesar de ser um produto considerado alimento, pode ser comercializado em farmácias, supermercados, casas de produtos naturais e outros (COSTA e OLIVEIRA, 2005; BRASIL, 2009).

3.1.3 Composição

Mais de 300 tipos diferentes de compostos foram identificados na própolis, incluindo ácidos alifáticos, ésteres, ácidos aromáticos, carboidratos, aldeídos, aminoácidos, cetonas, terpenoides, vitaminas e substâncias inorgânicas (MARCUCCI, 1995). De acordo Havsteen (2002), dentre todos os compostos encontrados na própolis, os flavonoides são os que mais interessam para pesquisas.

Com a própolis brasileira, diversos estudos realizados demonstraram a presença de diversos compostos fenólicos, sendo o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepellin-C), proveniente de áreas cuja flora é rica em vegetação de *Baccharis dracunculifolia* o componente mais estudado. A sua quantificação é um fator importante de qualidade da própolis brasileira (MATSUDA, 2008).

Os processos oxidativos produzem radicais livres, os quais causam problemas para a saúde como: doenças degenerativas, câncer, envelhecimento, diabetes, catarata, fragilidade óssea e falhas nos rins, devido à formação de ligações cruzadas no DNA e nas proteínas essenciais (SCHELLER et al., 1994). Dentre as fontes de radicais livres, podem ser citadas: raios solares, radiação, pesticidas e consumo de frituras. Para combatê-los no organismo, a alternativa é supri-lo com antioxidantes, como as vitaminas e os compostos fenólicos.

A própolis é considerada um antioxidante natural, ou seja, capaz de prevenir ou retardar processos oxidativos. Na indústria de alimentos, torna-se importante devido à sua utilidade como antioxidante natural no produto, além dos benefícios à saúde do consumidor, sendo importante para agregar valor aos alimentos (GÜLÇİN, 2012).

O comportamento antioxidante dos compostos fenólicos está relacionado com a capacidade para quelar metais, inibir a ação da enzima lipoxigenase e captar radicais livres. Os polifenóis, especialmente os flavonoides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, mostrando-se antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A dissociação do grupo hidroxila dos polifenóis é um indicador de

atividade antioxidante, pois o átomo de hidrogênio é doado aos radicais livres, neutralizando os efeitos (BARREIROS, DAVID E DAVID 2006).

Os efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos que compõem a própolis. Destes, os flavonoides podem ser considerados os principais compostos, encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas (PARK et al., 1995).

Os compostos fenólicos são os principais componentes químicos encontrados na própolis. A estrutura destes compostos é formada pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associados diretamente à estrutura cíclica (BURDOCK, 1998; BANKOVA, 2005).

Dentre os compostos fenólicos, aos flavonoides atribuem-se as principais propriedades terapêuticas da própolis. Os flavonoides são constituídos por quinze carbonos, distribuídos por dois anéis fenólicos conectados a uma unidade de três carbonos (LOTIFY, 2006; SFORCIN e BANKOVA, 2011), constituindo uma importante classe dos polifenóis presentes entre os metabólitos secundários dos vegetais (ZUANAZZI, 1999). Flavonas, flavonóis, diidroflavonois, flavanonas, chalconas e diidrochalconas são classes de flavonoides frequentemente encontradas na própolis (MARCUCCI, 1995). Propriedades como: proteção dos vegetais contra a incidência de raios UV e visível, contra fungos e bactérias, atração de polinizadores, controle dos hormônios vegetais, inibição de enzimas e antioxidantes são atribuídas aos flavonoides (ZUANAZZI, 1999).

A quantificação de alguns compostos fenólicos é utilizada para estabelecer a qualidade da própolis, como ácido cumárico, ácido ferúlico, galangina, quercetina, canferol e o Artepellin-C (MATSUDA, 2006). A classificação da qualidade varia de acordo com a aplicação, sendo o Japão o país com maiores exigências e controle de qualidade da própolis. No Brasil, não há exigência legal para cada tipo de composto fenólico, estabelecendo-se apenas o valor mínimo de 0,5% m/m de flavonoides e 5% m/m de compostos fenólicos totais (BRASIL 2001).

No Japão, há grande procura por própolis que contenha Artepellin-C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), um composto químico inicialmente isolado da própolis

brasileira, o qual tem despertado grande interesse em razão de suas propriedades biológicas (atividade antitumoral, pela promoção da apoptose e cura da leucemia, favorecendo o aumento da resposta imunológica, além de apresentar atividade antimicrobiana e antioxidante) (PAREDES-GUZMÁN et al., 2003). Este ácido fenólico foi isolado e quantificado por Aga et al. (1994), isolado como constituinte principal a partir da própolis brasileira da região sudeste.

A análise dos compostos fenólicos é utilizada para estabelecer a qualidade da própolis e o Artepelin-C é o componente mais recentemente reconhecido como parâmetro de qualidade (MATSUDA & ALMEIDA-MURADIAN, 2008). A molécula é composta de um anel fenólico com dois grupos fenil, conforme mostra a figura 5.

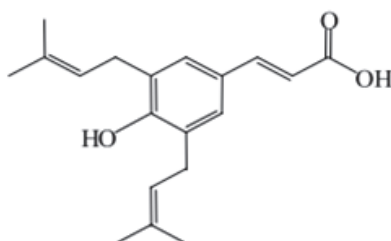


Figura 5: Estrutura Química do Artepelin-C
Fonte: Shimizu et al, 2004

3.1.4 Efeitos

A própolis é utilizada desde a antiguidade. Os egípcios a utilizavam para embalsamar cadáveres devido às propriedades antiputrefativas do produto. Também foi reconhecida por médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Plínio e Galeno (CAPASSO & CASTALDO, 2002). A própolis também era utilizada no tratamento de feridas e infecções. Nas escrituras antigas das civilizações chinesa tibetana, egípcia e greco-romana, encontraram-se receitas utilizando-se mel, própolis, larvas e abelhas para curar ou prevenir doenças (MARCUCCI, 1996). A própolis foi utilizada como cicatrizante em pessoas feridas pós-guerra, como na África do Sul, ao final do século XIX e em várias clínicas soviéticas após a Segunda Guerra Mundial (PEREIRA, SEIXAS & AQUINO NETO, 2002).

A própolis tem importância para o homem no uso veterinário (cicatrização de feridas, cortes pós-operatórios, no combate de hemorragias, no tratamento de mastite); na agricultura (no tratamento de doenças de plantas, substituindo produtos químicos); na indústria de cosméticos (cremes de beleza, pasta dental, shampoos, sabonetes) e na indústria de alimentos (pastilhas, bombons, chicletes) (COSTA e OLIVEIRA, 2005).

Diversos estudos científicos atribuem à própolis uma infinidade de usos, demonstrando seu potencial para atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (PARK et al., 1998), antitumoral e antioxidativa, hepatoprotetora, regeneração tecidual, citotóxica (BANSKOVA et al., 2000), antioxidante, cicatrizante e anestésica (LOTFY, 2006).

Mishima et al. (2005) estudaram o efeito anti-hipertensivo de extratos hidroalcoólicos de própolis verde. Foi realizado o tratamento com extrato etanólicos com 25% de extrato seco em ratos hipertensos e os mesmos apresentaram diminuição da pressão arterial e na taxa de batimentos cardíacos. Aoi et al. (2013) associaram a diminuição de pressão arterial e da resistência à insulina em ratos aos compostos fenólicos presentes na própolis. A insulina é reguladora da expressão apical da membrana do canal epitelial (ENaC) de Na^+ e pode facilitar o transporte de Na^+ do lado apical para o lado basolateral. A redução da insulina circulante pela própolis suprimiria a reabsorção de Na^+ mediada por ENaC nos túbulos renais, diminuindo a pressão sanguínea através do controle do líquido extracelular. Concluiu-se também que os compostos fenólicos potencializaram o efeito de outras vitaminas ao se estudar a dieta de ratos adicionada a extratos de própolis.

Vieira (2012) aplicou extrato de própolis na formulação de linguiça toscana e concluiu a eficiência do extrato na prevenção da oxidação lipídica e consequentemente obteve-se aumento da vida de prateleira, sendo aceita sensorialmente em porcentagens de 0,5 a 1,0% (m/m).

A própolis apresentou efeito antimicrobiano e inibitório em 21 espécies de bactérias e vírus (incluindo herpes e *influenza*), efeitos antioxidantes e anticâncer. A própolis apresentou efeito citotóxico em culturas de tumores em animais e humanos, incluindo carcinoma de mama, melanoma, tumores no cólon e rins (GRUNBERGER

et al., 1988). Li et al. (2007) observaram pela primeira vez que os extratos etanólicos de própolis brasileira inibiram significativamente o crescimento de células em metástase derivados de carcinomas de próstata e tumores primários derivados de células de câncer de próstata em humanos. Em um estudo realizado por Matsuno (1997), os autores encontraram que o Artepelin-C, composto isolado da própolis, exibe efeito citotóxico contra células malignas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, causando citotoxicidade em tumores e em células leucêmicas.

Ayres, Marcucci e Giorgio (2007) investigaram o efeito de extratos etanólicos de própolis coletados em Alagoas, Paraná e Minas Gerais no combate à infecção por *L. amazonensis* (leishmaniose). Todos os extratos foram capazes de reduzir a carga parasitária, monitorado pela porcentagem de macrófagos infectados em camundongos e o número de parasitas intracelulares. Para o extrato de própolis verde de Minas Gerais foram utilizadas concentrações de 3, 6, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL durante períodos de 24, 48 e 72 horas e observou-se a capacidade de reduzir significativamente a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas nas concentrações de 6 µg/mL a 100 µg/mL. Shimizu et al. (2008) indicaram que a própolis brasileira possui atividade contra o vírus *Influenza* e ameniza os sintomas provenientes da doença causada por este vírus em ratos.

Silva, Almeida e Sousa (2004) compararam o potencial irritativo de própolis, *Casearia sylvestris*, Otosporin e soro fisiológico (controle) para tratamento endodôntico. A substância que apresentou menor potencial irritativo foi a própolis.

3.1.5 Tecnologia de Extração

É inviável usar a própolis *in natura* (própolis bruta) e seus componentes devem ser extraídos utilizando-se algum solvente (PIETTA, GARDANA E PIETTA, 2002). A forma mais comum para utilização da própolis é na forma de extrato, especialmente para a medicina, indústrias de alimentos e cosméticos. Vários artigos descrevem procedimentos de extração diferenciados com diferentes solventes extratores. A escolha do solvente depende da finalidade do uso (ALDEMANN, 2005) e dos componentes que se desejam extrair.

A própolis é constituída de uma complexa mistura de substâncias de polaridades variadas. Por este motivo, não existe um único solvente que extraia todos os componentes de interesse. Diversos estudos mostram que o solvente mais utilizado é o etanol em concentrações variadas (PARK et al., 1998).

A composição química do extrato de própolis varia, além da matéria-prima, de acordo com o método de extração e o solvente. Produtos como comprimidos, cápsulas, ampolas e xaropes são preparados com o extrato etanólico de própolis (XU et al., 2009).

Em geral a própolis é um produto estável, mas suas condições de armazenamento são importantes. Própolis *in natura* e seus extratos devem ser armazenados no escuro, em recipientes herméticos e em locais frescos, preferencialmente com temperatura menor do que 10 °C (MALASPINA e PALMA, 2000).

Diversos métodos têm sido utilizados para a extração dos componentes bioativos da própolis, por exemplo: maceração, extração Soxhlet, a extração ultrassônica e extração por micro-ondas. Para as técnicas de maceração, o solvente orgânico é utilizado para dissolver o componente de própolis diretamente sem produção de calor (Cunha et al., 2004).

A maceração consiste em colocar em contato a matéria-prima com uma quantidade de solvente pré-estabelecida um período de tempo prolongado até se chegar na concentração de extrato desejada. As principais vantagens desta técnica são a simplicidade e o baixo custo, enquanto as desvantagens do processo são: lentidão, elevado índice de intumescimento e possíveis proliferações de micro-organismos, além da alta quantidade de solvente requerido. De acordo com Prytyk et al. (2003), no processamento da própolis, o etanol como solvente extrai ácidos graxos e flavonoides, enquanto ao se utilizar a acetona, monossacarídeos, glicerol e ácido cafeico são extraídos. Para a identificação dos componentes químicos da própolis, outros solventes também são empregados na extração, como o metanol (BANKOVA et al., 1998).

O uso do extrato etanólico da própolis destaca-se pelas propriedades farmacológicas em *sprays* antissépticos bucais e nasais, assim como o uso do extrato

puro no combate a gripes e resfriados. As atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, antioxidante e estimuladora do sistema imunológico vêm proporcionando a aplicabilidade pela indústria farmacêutica e alimentícia, na forma de alimentos funcionais (Park et al., 1998).

Malaspina e Palma (2000) descrevem que a metodologia mais usada pelas unidades processadoras é a extração em etanol 70%, devido à maior solubilidade do produto neste solvente e maior extração de compostos bioativos na maceração convencional. Outros processos de extração mais comuns são: em maceração em água, por gás carbônico supercrítico e por emulsificação (SUZUKI, 2000).

Diversas metodologias de extração foram utilizadas por pesquisadores para o estudo de própolis. Cunha et al. (2004) utilizaram a maceração com etanol absoluto e concentrações de 70%, 50 % e 30 % (v/v) com água destilada e também com o etanol comercial (96%), por 7, 10, 20 e 30 dias, com e sem luz. O rendimento do extrato de própolis aumentou com o conteúdo no solvente sendo que, este aumento se estabilizou usando solventes com 70 % ou mais de etanol.

A maceração é utilizada ao longo de décadas como forma mais comum de obtenção de extratos (AZMIR et al., 2013) com finalidade de extração de óleos essenciais e compostos bioativos de distintas matrizes. Este processo consiste na diminuição do tamanho das partículas da amostra a ser extraída, aumentando a superfície de contato, seguida da adição do solvente em volume padronizado e agitação ocasional da mistura. Decorrido o tempo de processo, o material é filtrado.

Os melhores resultados de atividade antioxidante e antimicrobiana em extratos de própolis obtidos por Park et al. (1998) foram os extratos obtidos com maceração em etanol de 60 a 80%, em estudos com extratos de própolis de Minas Gerais através de maceração com misturas de água destilada e etanol contendo de 0 a 95% (v/v) de etanol.

Biscaia & Ferreira (2009) compararam o rendimento de extração de própolis obtidas por diferentes procedimentos: extração com fluido supercrítico em uma fase, com CO₂ e CO₂ mais co-solvente e em duas fases, bem como de Soxhlet e maceração como métodos de extração a baixa pressão, utilizando etanol, acetato de etila, clorofórmio, n- hexano, água e misturas de água/etanol. O maior rendimento foi obtido

por clorofórmio em extração Soxhlet (73 ± 2 %, m/m). Este solvente, entretanto, não pode ser ingerido.

A análise de rendimentos de extração, teores de fenóis totais e flavonoides da própolis utilizando solução etanólica e óleos vegetais como solventes foram feitas por Buriol (2008). Verificou-se que o solvente mais eficiente para a extração da própolis, considerando maiores rendimentos de extração dos compostos da resina como um todo e das substâncias fenólicas, principalmente os flavonoides, foi a solução etanol: água 70:30 (v/v) e que o óleo de canola possui baixo poder de extração, sendo necessário um tempo muito longo de agitação.

Santos et al. (2003) realizaram um trabalho com o objetivo de otimizar o processo de extração de própolis visando determinar a melhor relação etanol: água (de 0:100 a 90:10) como solvente sob maceração dinâmica por 14 dias com posterior filtragem para maior atividade inibitória de *S. aureus*. Foi utilizada a relação de 1:10 de sólido: solvente (própolis: solução alcoólica). Os melhores resultados foram obtidos com extratos contendo 50 a 90% de etanol com halo de inibição de 10 mm. O trabalho sugere a utilização do teor alcoólico de 70% como a ideal para a obtenção dos extratos de própolis visto que há muito tempo é conhecido que a eficácia antimicrobiana do álcool na presença da água é aumentada nas concentrações próximas a 70% (v/v).

A atividade antifúngica e teor de flavonoides foram comparados por Longhini et al. (2007) em extrato etanólicos preparados por turboextração, com concentração de própolis variando entre 5% e 30% (m/m), utilizando-se álcool 93,7% (m/m) e glicólicos, preparados com propilenoglicol em três concentrações entre 30% a 50% (v/v), mantendo uma concentração fixa de própolis (m/m) (metodologias de preparação dos extratos patenteadas). Verificou-se que para ambas as análises, os extratos etanólicos mostraram-se de melhor qualidade que os extratos glicólicos, pois os extratos etanólicos apresentaram teor de flavonoides maiores que os extratos glicólicos e estes compostos foram associados também à atividade inibitória das 67 leveduras de interesse médico isoladas de casos clínicos (onicomicoses) de pacientes atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas de Maringá/PR.

Chen et al. (2007) analisaram a extração com fluido quente pressurizado (120 °C e 50 psi) de sete flavonoides, ácido cafeico e quatro ácidos fenólicos de própolis

brasileira, considerando etanol 95% (v/v) como solvente para extrato solúvel em óleo e etanol 20% (v/v) para extrato solúvel em água. O teor de sólidos do extrato solúvel em água obtido por fluido quente pressurizado na presença de 29% (m/m) de surfactante natural foi 44% maior do que a obtida sem surfactante natural. Porém, a quantidade de flavonoides e ácido cafeico no extrato solúvel em óleo excedeu os dos extratos solúveis em água, enquanto a quantidade dos quatro ácidos fenólicos presentes no extrato solúvel em água era maior do que os do extrato oleoso.

Para o aumento porcentual do teor de flavonoides e outros compostos interessantes no extrato de própolis, comumente é realizada na indústria a concentração do produto. Porém, o uso de altas temperaturas para concentração dos extratos pode degradar alguns dos compostos. Mello, Petrus & Hubinger (2010), realizaram nanofiltração com extrato aquoso e etanólico. Para a solução etanólica, a membrana reteve 53 % dos compostos fenólicos e 90 % dos flavonoides.

Tylkowski *et al.* (2010) também estudaram a tecnologia de nanofiltração para a concentração de extratos etanólicos de própolis e foi verificado que o extrato pode ser concentrado em relação maior que três vezes, além da retenção de mais de 95% de flavonas, flavonóis, flavononas, dihidroflavonóis e fenólicos.

Moraes (2007) comparou diferentes extrações de própolis dos grupos 12 e 13 e suas atividades biológicas. Verificou-se que para própolis do grupo 12, tipo verde, a acetona mostrou-se como melhor solvente extrator para compostos flavonoides, enquanto o hexano demonstrou maior eficiência na extração especificamente de Artepellin-C. Para o etanol, a eficiência em extração de flavonoides foi dada em concentrações de 50 a 100%. Em relação à atividade antimicrobiana, os extratos do grupo 12 apresentaram melhor atividade contra *P. aeruginosa* e menor atividade para *S. aureus* em relação aos extratos obtidos da maceração de própolis do grupo 13 (vermelha).

Diehl (2008) investigou a influência da temperatura, pressão e porcentagem de etanol como co-solvente no processo de extração e fracionamento com dióxido de carbono supercrítico de princípios ativos presentes no extrato etanólico de própolis. A atividade antimicrobiana também foi avaliada para os micro-organismos patogênicos: *S. aureus*, *Candida albicans* e *E. coli*. Os maiores rendimentos globais para a extração

supercrítica foram obtidos quando se adicionou 15% de etanol como co-solvente, apresentando também inibição contra *S. aureus*.

3.2 Alta Pressão Isostática

No fim do século XIX (1889) ocorreram os primeiros experimentos por Hite, com aplicação de alta pressão em alimentos, demonstrando que a vida de prateleira de leite cru podia ser aumentada em quatro dias após tratamento a 600 MPa por 1 hora em temperatura ambiente (SMELT, 1998). Segundo Knorr (1993), o processamento por alta pressão tem sido aplicado com sucesso para pasteurização e esterilização em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Atualmente, dois métodos de processamento de alimentos à alta pressão têm sido investigados: o método hidrostático e o método de homogeneização (CAMPOS, DOSUALDO E CRISTIANINI, 2003). O uso da tecnologia de alta pressão, entretanto, demanda um alto investimento para a aquisição dos equipamentos (MEYER et al., 2000).

De acordo com Cheftel (1995), esta tecnologia consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de um vaso pressurizado, no qual a pressão é transferida da forma indireta, através de um líquido de baixa compressibilidade, como a água. O método baseia-se em dois princípios gerais: princípio de *Le Chatelier* (qualquer fenômeno, acompanhado por uma redução de volume é favorecido pelo aumento de pressão) e o princípio isostático (a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea através de uma amostra biológica). O processo de pressurização é, portanto, independente do volume e da forma da amostra, ao contrário do processo térmico.

A energia mecânica de pressurização, dentro do recipiente, resulta em uma geração de calor moderada e temporária que é chamada de calor adiabático, onde a cada 100 MPa de pressão, a temperatura dentro do recipiente é aumentada de 3 a 6 °C, dependendo do sistema, que pode variar conforme a natureza do produto, a temperatura do processo e a pressão aplicada (FARKAS & HOOVER, 2000).

O produto é embalado em garrafas ou recipientes plásticos que são selados e colocados no interior do vaso de pressão. Ao término do processamento, o vaso é descomprimido e retira-se o produto. A pressurização é realizada em espaço confinado, onde se emprega um fluido (água) que vai atuar como meio de transferência da pressão, onde a mesma é isostaticamente aplicada (LAVINAS, LOPES e MESQUITA, 2007). Segundo Farkas & Hoover (2000) durante o processo de alta pressão, ocorre uma redução de 15% na pressurização do alimento, bem como ocorre expansão na despressurização. Assim, as embalagens que são utilizadas para processamento em Alta Pressão Isostática precisam possuir a capacidade tanto em reduzir quanto em expandir, sem que haja perda da integridade do material e da selagem utilizada.

O processamento utilizando o alimento embalado elimina qualquer risco de contaminação, com lubrificantes ou com qualquer outra parte mecânica do equipamento. Não é necessário a sanitização entre um produto e outro, eliminando qualquer possibilidade de contaminação do mesmo (CHEFTEL, 1995).

3.2.1 Efeito da Alta Pressão na Extração de Compostos Bioativos

Suplementos nutricionais, alimentos funcionais, nutracêuticos e produtos de higiene pessoal possuem mercado em forte expansão. Consequentemente, o processamento de produtos contendo compostos biologicamente ativos são de grande interesse das indústrias devido ao mercado consumidor que procura e entende cada vez mais sobre estes compostos. Neste contexto, o processamento de produtos por alta pressão pode ajudar a enfrentar o desafio de produzir, a partir de fontes naturais e sem danificar biologicamente compostos ativos, ingredientes com baixa contagem microbiana e livre de patógenos (TORRES & VELAZQUEZ, 2005).

Diferentes técnicas tradicionais de extração, como Soxhlet, refluxo a quente, ebulição, destilação e extração em água quente tem sido amplamente utilizadas para isolar antioxidantes de plantas, porém nenhum pode ser considerado o método ideal para esta finalidade (Zhang, Junjie & Changzhen, 2004). De acordo com Jun et al.,

(2009), o uso do processamento à alta pressão é uma nova técnica para a extração de compostos bioativos em produtos naturais.

Corrales et al. (2009), avaliaram o efeito de um tratamento térmico a 70 °C, combinada com o efeito de diferentes tecnologias emergentes, tais como ultrassons (35 kHz), alta pressão hidrostática (600 MPa) e os campos elétricos pulsados (3 kV/cm) para extração de antocianinas de cascas de uvas vermelhas. Após 1 h de extração, a amostra processada por alta pressão apresentou três vezes maior teor de antocianinas que a amostra controle.

Jun et al. (2009) estudaram as condições para extração por alta pressão hidrostática de polifenóis de folhas de chá verde, com pressões entre 100 e 600 MPa, variação de solvente (acetona, metanol, etanol e água), concentração de etanol (0 a 100%), de 1 a 10 minutos e relação sólido: líquido de 1:10 a 1:25 g/mL. Em comparação com outros métodos de extração (extração à temperatura ambiente - maceração, ultrassom e fluxo térmico) o processamento à alta pressão forneceu rendimentos de extração mais altos, com maior seletividade. A melhor condição foi sob pressão de 500 MPa, com 50% de etanol e relação sólido: líquido de 1:20, por 1 minuto.

O efeito do processamento por alta pressão hidrostática foi estudado por Shouqin, Jun & Changzheng (2005) na extração de flavonoides (crisina e galangina) em própolis. Os pesquisadores variaram a concentração do solvente (etanol de 35 a 95%), com pressões de 100 a 600 MPa, relação sólido: líquido de 1:5 a 1:45 g/mL por 1 a 10 minutos. As amostras extraídas por alta pressão por um minuto, a 500 MPa, concentração de 75% (v/v) de etanol no solvente e relação sólido: líquido de 1:35 tiveram um nível maior de flavonoides do que as obtidas por extração às condições de temperatura ambiente e pressão atmosférica por sete dias (utilizando-se de 70% etanol como solvente e relação sólido: líquido de 1:3.5) e do que as obtidas por ebulição a 85 °C, 95% de etanol e relação sólido: líquido de 1:4.

Fauzi, Farid e Silva (2014) avaliaram que processando o mel (tipo Manuka) a 600 MPa durante 10 min, obtiveram aumento de compostos fenólicos totais (47,16%) em relação ao mel não processado, enquanto não houve aumento significativo através de tratamento térmico (50, 60 e 70 °C de 10 a 30 minutos) e processamento térmico

combinado à alta pressão (600 MPa). Os autores acreditam que o aumento destes compostos bioativos deve-se à extração dos mesmos presentes nos grãos de pólen, invisíveis a olho nu, que podem estar contidos no mel e evidenciados devido ao rompimento das células dos mesmos pela alta pressão. As membranas celulares e organelas do pólen presente no mel são rompidas e enzimas são liberadas, aumentando então o conteúdo fenólico nas amostras.

A extração de flavonoides de lichia por tecnologias ultrassônica (40 kHz), por alta pressão (200 e 400 MPa) e convencional (estática), com 5 g de pericarpo de fruta seca em 200 mL de solução etanol: HCl (85:15 v/v) por 30 minutos a 25 °C foram estudadas por Prasad et al. (2009). Após este período, o teor de flavonoides totais detectado foi de 0,65, 0,75, 0,29 e 0,07 mg/g de peso seco por extração a 200 MPa, 400 MPa, extração ultrassônica e convencional respectivamente.

Shouqin, Ruizhan e Changzheng (2007) avaliaram o processo de extração de ginsenosídeos de raízes de ginseng utilizando a tecnologia de alta pressão (500 MPa, solvente etanol 50%, relação sólido: líquido de 1:75, temperatura ambiente por 2 minutos) e compararam com outras técnicas de extração: refluxo de água por 4 horas, refluxo de solução 50% etanol por 4 horas, extração ultrassônica com solvente 50% etanol por 30 minutos, CO₂ supercrítico com 3% de etanol. No processamento por alta pressão, obtiveram 7,33% de ginsenosídeos enquanto as concentrações por outras tecnologias variaram de 2,32 a 5,89%.

A extração por alta pressão foi utilizada para extrair compostos fenólicos do pericarpo da fruta longan (*Dimocarpus longan*). As influências de diferentes solventes, concentração de solvente (25-100%, v/v) e proporção de sólidos para líquido (1:25-1:100, m/v) foram determinadas. A extração foi realizada a diversas pressões (200-500 MPa), durações (2,5-30 minutos) e temperaturas (30- 70°C). O rendimento de extração, fenólicos totais conteúdos e atividades de eliminação de ânion superóxido e radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foram examinadas e concluiu-se que a atividade antioxidante (DPPH) do extrato obtido por alta pressão com etanol 50%, relação sólido: solvente de 1:5 m/v, 500 MPa por 2,5 minutos a 30 °C é maior em 50% em relação à extração convencional com os mesmos parâmetros de relação sólido: solvente, temperatura e solvente por 12 horas quando usada uma concentração de 50 µg/mL (PRASAD, 2009).

Patras et al. (2009) avaliaram o efeito dos tratamentos de alta pressão e térmica convencional nos grupos principais de antioxidantes (polifenóis, ácido ascórbico e antocianinas) e na cor de purê de morango e de amora. Os produtos foram submetidos ao tratamento de alta pressão (400, 500, 600 Mpa min/10-30 MPa/15 ° C) e tratamento térmico (70 ° C / 2 min). O processamento por alta pressão não causou mudança no teor de ácido ascórbico, enquanto pelo processamento térmico ocorreu degradação do ácido ascórbico em 21%. Não foram observadas alterações significativas nas antocianinas entre os purês não tratados e os submetidos à alta pressão, mas houve redução significativa pelo tratamento térmico.

3.3 Uso tecnológico do Ultrassom

Na Rússia, Sokolov, em 1929, registrou experiências utilizando cristais de quartzo para introduzir vibrações ultrassônicas em materiais. Em 1942, Sproule desenvolveu o primeiro aparelho de ultrassom e em 1947, o cabeçote angular que permitia a introdução do som em diversos ângulos no material, sem a produção de sinais indesejáveis. Desde então, os princípios gerais do método permaneceram os mesmos. Os maiores desenvolvimentos foram na instrumentação eletrônica e introdução da microinformática (COSTA, 2011).

Dolatowski *et al.* (2007) citou que o ultrassom quando propagado através de uma estrutura biológica induz compressões e depressões das partículas do meio e uma alta quantidade de energia pode ser transmitida.

A alta quantidade de energia resulta na produção de calor, aumentando a interatividade entre as propriedades acústicas e térmicas dos tecidos onde a onda irradia bem como o coeficiente de absorção, a condutividade térmica e o calor específico do tecido ou meio irradiado (MAGGI et al., 2008).

Longo (2008) relatou que quando os tecidos atingem a faixa de temperatura entre 40 e 45°C, por aproximadamente cinco minutos, obtém-se os seguintes efeitos biológicos: aumento da permeabilidade das membranas e difusão celular, potencialização do transporte de íons de cálcio através das membranas celulares,

aumento da síntese e elasticidade do colágeno, aumento da síntese proteica e da atividade enzimática, dentre outras alterações fisiológicas. Entretanto, temperaturas acima desta faixa podem causar danos celulares e abaixo desta faixa podem não causar os efeitos desejados.

Segundo Carvalho (2010) os efeitos mecânicos, ou não térmicos decorridos do processamento por ultrassom são: micro fluxo acústico (movimentos unidirecionais), micro agitação (movimentos produzidos por ondas ultrassônicas de baixa frequência, intensidade e amplitude) e cavitação. Ondas longitudinais formadas quando o ultrassom entra em contato com o meio líquido (solvente) produzem o fenômeno de cavitação, devido à criação de regiões de compressão e expansão, formando bolhas de ar.

As áreas de medicina, indústria química e engenharia têm explorado o uso do ultrassom desde a sua descoberta. Com os avanços nos estudos dessa tecnologia e o entendimento de seus mecanismos de ação, iniciaram-se, por volta de 1950, estudos com a finalidade de processamento, preservação e extração de diversas substâncias em alimentos. Diversos estudos têm mostrado, também, sua eficiência nos processos de cozimento, congelamento/descongelamento, cristalização, emulsificação, filtração, moldagem, corte, extração, secagem, desgaseificação e maturação em diferentes matrizes alimentares (DOLATOWSKI et al., 2007).

Efeitos físicos, mecânicos ou químicos de ondas de ultrassom de alta energia são capazes de alterar propriedades do material incidido, como rompimento físico e aceleração de certas reações químicas. Ultrassom de alta intensidade também tem sido utilizado por muitos anos para gerar emulsões, romper células e dispersar materiais agregados. Jayassoriya (2004) também citou que o ultrassom pode ser utilizado na inativação enzimática e indução de reações de oxidação e Tao & Sun (2015) citaram também a separação de compostos, além da extração.

Na indústria de alimentos a aplicação de ultrassom pode ser dividida em duas categorias distintas: baixa energia (baixa potência e intensidade) e alta energia (alta potência e intensidade) (FELLOWS, 2000). Segundo Dolatowski (2007), o ultrassom de alta energia (alta potência e alta intensidade) correspondem a intensidades de ondas de ultrassom maior que 1 W/cm^2 e frequências de 18 a 100 kHz.

De acordo com Alissandrakis et al. (2003), o processamento por ultrassom pode ser utilizado para a extração de compostos voláteis de plantas, utilizando de solventes orgânicos. A amostra de planta triturada é colocada em contato com o solvente em um recipiente e imerso em banho de ultrassom, por um tempo determinado. Após o processamento, o extrato é filtrado.

3.3.1 Efeito do Ultrassom na Extração de Compostos

A eficiência de métodos de extração a baixa pressão pode ser potencializada quando o processamento convencional é combinado a tecnologias como ultrassom e micro-ondas. Estes métodos têm sido utilizados para extração de compostos de diversas matrizes (VILKHU et al., 2008).

A técnica de processamento por ultrassom com finalidade de extração visa potencializar a extração de métodos convencionais com a vantagem de utilizar uma menor quantidade de solventes orgânicos, por menor tempo de processamento e evitando a degradação de compostos sensíveis termicamente (GHASEMI et al., 2007).

Segundo Wang e Weller (2006), o processamento de extração assistida por ultrassom demanda equipamento de baixo custo, tem fácil manuseabilidade e se baseia no uso da energia proveniente de ondas de ultrassom (frequência maior que 20 kHz).

Bolhas de cavitação são produzidas durante a aplicação do ultrassom e o aumento da pressão e temperatura causado pela compressão leva ao colapso das bolhas. Como resultado deste colapso, uma onda de choque passa através do solvente, potencializando a extração (PANIWNYK et al., 2001). Adicionalmente, as ondas de ultrassom exercem efeito mecânico, permitindo maior penetração do solvente na matriz e assim, aumentando a área de contato entre as fases sólidas e líquidas.

De acordo com Chemat et al. (2011), o aumento da permeabilidade das paredes celulares devido ao processo de cavitação é a principal contribuição da

tecnologia de ultrassom para a extração de compostos. Paniwnyk et al. (2001) relatam que as bolhas de cavitação são produzidas durante a aplicação do ultrassom e o aumento da pressão causado pela compressão colapsam-nas. Após o colapso, uma onda de choque passa através do solvente, potencializando a extração.

Vinatoru (2001) relata que o processamento por ultrassom facilita a dilatação e a hidratação do material, aumentando o tamanho dos poros da parede celular e otimizando os processos de difusão e de transferência de massa. Um aumento no tecido celular ao dobro do seu volume pode, em alguns casos, quebrar a parede celular, o que causa a saída de compostos celulares, além de aumentar a eficiência de extração.

De acordo com Soria e Villamiel (2010), o processamento assistido por ultrassom permite melhor penetração do solvente nas células da matriz. Bolhas de cavitação podem ser geradas perto da superfície do sólido e durante o ciclo de compressão se produz o colapso da bolha, no qual um micro jato é criado na parede da célula da matriz do produto a ser extraído. Portanto, as vantagens do ultrassom são: aumento de transferência de massa, melhor penetração de solvente, menor dependência de uso de solventes, extração em temperaturas mais baixas, as taxas de extração mais rápidas e maiores rendimentos de produto.

O efeito do ultrassom nos teores de extração é atribuído ao micro fluxo e alta transferência de massa produzida pela cavitação e colapso de bolhas resultando em ruptura celular (ADAM et al., 2012).

De acordo com Garcia-Salas et al. (2010), o processamento por ultrassom é uma alternativa econômica aos processos de extração tradicionais que utilizam matérias primas de custo elevado.

Segundo Trusheva et al. (2007), a técnica de ultrassom pode reduzir o tempo de processo e a quantidade de solvente necessária para a extração. Esta técnica é usada para a dissociação de própolis em solução.

Claver et al. (2010) aperfeiçoaram o processo de extração de polissacarídeos de malte de sorgo chinês em água através da técnica de ultrassom. Os pesquisadores variaram a potência do ultrassom (500, 600 e 700 W), o tempo de ultrassom (3,5, 4,0 e 4,5 minutos) e relação água e sorgo maltado (25, 30 e 35 mL/g), obtendo os

melhores parâmetros de processo, para rendimento de 17,08% de polissacarídeos, de 600 W de potência por 4 minutos e relação solvente (água): sólido (sorgo) de 30 mL/g.

Trusheva, Trunkova e Bankova (2007) realizaram um estudo da extração de compostos biologicamente ativos da própolis por diversos métodos. No caso da extração por ultrassom, os pesquisadores concluíram que o teor de flavonoides e compostos fenólicos no extrato aumenta com o tempo de processamento até 30 minutos a 300 W e 25 °C, sendo o método mais apropriado comparando-se à extração por micro-ondas e maceração convencional, devido ao menor tempo de processo e seletividade de extração. Não houve diferença significativa para este processamento na extração entre o uso da relação sólido: solvente (etanol 70%) 1:10 e 1:20.

Ma et al. (2008) realizaram testes para extração de compostos fenólicos de cascas de *Citrus unshiu Marc*, variando o tempo, a temperatura e a potência do ultrassom. Os pesquisadores observaram que o fator tempo é importante durante o processamento, pois o teor de compostos fenólicos, em temperatura e potência padronizados, aumentou em 41,45% quando o tempo de processamento variou de 10 para 60 minutos. Os pesquisadores encontraram ainda que para ácidos fenólicos, os melhores parâmetros foram o uso de potência de 8 W por 20 minutos a 30 °C enquanto para flavanonas glicosiladas de 40 °C por 60 minutos na mesma potência.

A extração de polifenóis de cascas de jatobá assistida por ultrassom, com potência de 60 W por 40 minutos e relação sólido: solvente (água) de 1:20 (m/m) foi realizada por Veggi (2012), comparando-se à extração feita sob agitação. O teor obtido na extração assistida por ultrassom foi 12% maior, durante o mesmo tempo de processamento.

Rabelo et al. (2016) avaliaram a extração de compostos fenólicos de resíduos de alcachofras por ultrassom. Foi utilizado o mesmo equipamento do presente estudo, com frequência de 20 kHz, relação sólido: solvente de 1:10 (m/v), com tempos de 5 a 60 minutos, concentração de etanol no solvente de 0 a 75% e potências de 0, 240, 480 e 720 W. A melhor extração obtida utilizou o solvente com 50% de etanol, 240 W de potência por 10 minutos de processamento no ultrassom.

A otimização da extração de compostos fenólicos e antocianinas de bagaço de mirtilo assistida por ultrassom foi realizada em estudo de He et al. (2016). Os pesquisadores variaram o tempo de processamento de 15 a 35 minutos, a relação sólido: solvente de 1:15 até 1:25 (m/v) e a temperatura de 50 a 70 °C utilizando como solvente 70% de etanol e 0,01% de ácido clorídrico, na potência de 400 W. Obteve-se no processamento assistido por ultrassom, em 3,3 minutos, o mesmo teor de compostos fenólicos encontrado na extração convencional em 53 minutos. A maior extração de compostos fenólicos e antocianinas por ultrassom foi obtida utilizando-se a temperatura de 61 °C, relação sólido: solvente de 1:22 (m/v) por 24 minutos.

Yeo, Leo e Chan (2015) avaliaram o efeito do solvente e pH para extração de própolis da Malásia e obtiveram um valor 3 vezes maior de atividade antioxidante de própolis submetida ao ultrassom por 100 minutos com etanol 30% e pH 10 em relação à maceração estática por 24 horas, etanol 70% e sem ajuste de pH.

Machado (2015) realizou extração de açúcares prebióticos de resíduos de alcachofra por ultrassom com sonicação direta, ultrassom por sonicação indireta e maceração. O processamento por ultrassom com sonicação direta apresentou melhor rendimento de extração de açúcares prebióticos por 10 minutos, 60 °C, 360 W, 20 kHz e relação sólido: solvente (água) 1:40 (m/m).

No estudo de Ghassempour et al. (2008), os pesquisadores obtiveram 82% do teor de antocianinas de cascas de uva por ultrassom no tempo de 3 horas e relação sólido: solvente (etanol 99%/HCl 1%) 1:25 (m/v) enquanto na maceração convencional por 48 h obteve-se 98%.

A extração de antocianinas de framboesas por ultrassom foi realizada por Chen et al. (2007), variando-se a relação sólido: solvente, potência do ultrassom e tempo de processo. Os pesquisadores encontraram que os melhores parâmetros de processo foram: 400 W de potência por 3 minutos e 20 segundos na relação sólido: solvente de 1:4 (m/v).

Barrales (2015) obteve rendimento global 29% maior de óleo de semente de maracujá utilizando-se a técnica de ultrassom em extração supercrítica comparado a outras técnicas convencionais a baixa pressão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento da pesquisa foi realizado no Laboratório de Tecnologias Emergentes do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, no Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (ambos em Campinas/SP), na empresa MN Própolis Ind. Com. e Exp. LTDA e no laboratório Cetel – Centro Tecnológico de Análise de Alimentos (ambos em Mogi das Cruzes/SP).

4.1 Material

4.1.1 Matérias-Primas

As matérias-primas (própolis e álcool de cereais) foram cedidas pela empresa MN Própolis Ind. Com. e Exp. LTDA, localizada em Mogi das Cruzes, São Paulo.

A amostra de própolis foi obtida na região sul de Minas Gerais/Brasil (cidade de Juiz de Fora), da raspagem das partes internas, bordas de melgueira e tampas das colmeias localizadas em mata nativa contendo alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) e coletada no mês de Abril do ano de 2015.

Toda a própolis utilizada foi adquirida de um mesmo lote e mesmo fornecedor, a fim de minimizar a influência da variabilidade quanto à vegetação e clima. O produto foi inspecionado e retiraram-se pedaços de madeira, abelhas mortas e outros tipos de materiais estranhos. Quinze kg do produto foram segregados para utilização durante o projeto, triturados em liquidificador (Walita, 500 W), peneirados e padronizados para granulometria menor que 0,5 mm (35 mesh) por peneira vibratória. As amostras foram então fracionadas em embalagens de polietileno-náilon sob vácuo contendo 50 g da própolis (pesados em balança Shimadzu, modelo BL3200H) e armazenadas ao abrigo

da luz e controle de temperatura inferior a 0 °C até dezesseis horas antes do processamento, quando foram retiradas do congelamento para estabilização com a temperatura ambiente até o momento do processamento.

O etanol 96% (v/v) foi diluído com água destilada em etanol 80% (v/v) para a realização dos experimentos.

4.1.2 Embalagens

As embalagens para processamento das amostras foram adquiridas da empresa Schur e são de material polietileno de baixa densidade laminado com náilon (5 camadas), incolor, de TPVA (38°C, 90% UR) 2 a 3,5 g H₂O/m².24h.atm e TPO² (23°C, 75% UR) 30 a 53 cm³/m².24h.atm.

Os frascos de vidro cor âmbar para armazenamento das amostras foram adquiridos da empresa Wheaton e os batoques e tampas da empresa Gerresheimer.

4.1.3 Equipamento de Alta Pressão Isostática

Os processamentos de alta pressão foram realizados em equipamento de alta pressão isostática com câmara de 2 L, controle de temperatura até 90 °C e pressão de operação até 690 MPa (Avure Technologies, UK), do laboratório de Tecnologias Emergentes do Departamento de Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, conforme mostra a Figura 6.



Figura 6: Equipamento de Alta Pressão Isostática

4.1.4 Equipamento de Ultrassom

O sistema de ultrassom (Grupo Unique, modelo DES500) é composto por uma unidade de transdutor (macropona de titânio) de 13 mm de diâmetro, com frequência de 20 kHz e um controlador de potência de saída variável de 20 a 99% da potência total (800W), mostrado na figura 7.

Utilizou-se um banho de aquecimento (Marconi, modelo MA184) acoplado ao sistema para manutenção da temperatura da amostra por camisa.



Figura 7: Unidade de Ultrassom

4.1.5 Padrões e Reagentes

Foram utilizados padrões de Artepelin-C, Quercetina e Ácido Gálico da marca Wako Pure Chemical.

Os reagentes com grau de pureza HPLC e PA: álcool etílico, metanol, ácido acético, nitrato de alumínio, acetato de potássio e carbonato de sódio são da marca Merck e o reagente de Folin-Ciocalteu marca Sigma.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da matéria-prima para análises

4.2.1.1 Teor de Umidade da Matéria-Prima

Seguiu-se a metodologia referente à legislação brasileira (BRASIL, 2001). Aproximadamente 3 g de própolis bruta (pesados em balança analítica Shimadzu, modelo BL3200H) foram acondicionados em cadinho de porcelana previamente aquecido em estufa a 105 °C, por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto foi repetido com intervalos de 2 h, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5 mg). Esta análise foi realizada em triplicata e a perda por dessecação a 105 °C foi calculada pela razão entre a massa do material volatilizado e a massa inicial de própolis, em porcentagem.

4.2.1.2 Preparação do extrato etanólico de própolis para análise de flavonoides e compostos fenólicos na matéria-prima

A preparação para a obtenção do extrato etanólico de própolis para análise de flavonoides totais na própolis *in natura* foi baseado no procedimento de Park et al. (1995), com modificações.

Foram pesados em balança analítica Shimadzu, modelo BL3200H, 0,3 gramas de própolis bruta triturada em liquidificador Walita 500 W, transferiu-se para um tubo de centrifuga e adicionou-se 15 mL de solução de etanol 80%, agitando-se a 100 rpm por 10 minutos. Após este período, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 3 minutos em centrífuga (Hermle Z 320) e o sobrenadante foi filtrado através de papel filtro (Advantec 5 A) para um balão volumétrico de 50 mL. O procedimento foi repetido por mais três vezes, porém nas extrações seguintes foram utilizados 10 mL de solução de etanol 80%. Os extratos foram misturados e o volume do balão foi completado com etanol 80%.

4.2.1.3 Preparação do extrato metanólico de própolis para análise de Artepelin-C na matéria-prima

Para o preparo do extrato metanólico de própolis para análise de Artepelin-C na própolis *in natura*, seguiu-se a metodologia descrita por Matsuda (2006). Foram pesados 0,4 g (balança Shimadzu, modelo BL3200H) de própolis triturada em liquidificador Walita 500 W que foram transferidos para um balão de fundo chato e adicionou-se 20 mL de metanol. A extração foi feita a 60 °C, em banho de água (marca Quimis, modelo Q-334-24, número de série 1127171) termostatizado, por uma hora. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos em centrífuga (Hermle Z 320). Os extratos foram filtrados em papel filtro (Advantec 5 A) para tubos de ensaio. Ao resíduo adicionou-se 20 mL de metanol e a extração foi realizada novamente nas mesmas condições. Os sobrenadantes obtidos das duas extrações foram homogeneizados e armazenados em frascos âmbar, a 5 °C.

4.2.2 Extração dos Compostos Bioativos da Própolis Verde por Alta Pressão

Para o processamento por alta pressão, foram utilizadas as amostras de própolis bruta moídas preparadas conforme seção 4.1.1. O solvente (solução etanólica em água 80% v/v) foi adicionado imediatamente antes do processamento e as embalagens foram seladas à vácuo em embalagem polietileno-náilon. Os processos foram realizados em triplicata. Imediatamente após cada processamento, as amostras foram filtradas por gravidade em papel filtro por 10 minutos. O produto não foi submetido à centrifugação para que não houvesse interferência da rotação na extração da própolis. Após a filtragem, os extratos foram acondicionados em frasco de vidro âmbar, fechados com batoque e tampa e identificados até o momento da análise, realizada em duplicata para cada triplicata de amostra.

Os primeiros processamentos foram realizados determinando-se o tempo de processo (1 minuto), a temperatura (40 °C) e a relação sólido: solvente – massa/massa (01:02) e variando a pressão de 25 a 600 MPa.

Após as análises do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e Artepelin-C dos extratos obtidos, procedeu-se à seleção das pressões cujos processos resultaram em extratos com maiores valores de compostos bioativos, avaliando-se então, o tempo de processamento e mantendo-se a temperatura e a relação sólido: solvente fixa.

Decorrida a avaliação do melhor tempo de processo, procedeu-se com a variação de temperatura para avaliação da influência e, por fim, variou-se a relação sólido: solvente para avaliação dos melhores parâmetros de processamento para a obtenção da maior extração dos compostos da própolis.

4.2.3 Extração dos Compostos Bioativos da Própolis Verde por Maceração

4.2.3.1 Maceração Estática

Para o processamento por maceração estática, foram utilizadas as amostras de própolis bruta moídas preparadas conforme seção 4.1.1.

O solvente foi adicionado imediatamente antes do processamento e as embalagens foram seladas à vácuo em embalagem polietileno-náilon.

As amostras foram colocadas em banho termostatizado (marca Quimis, modelo Q-334-24, número de série 1127171) a 40 °C e pressão atmosférica (0,1 MPa), com o mínimo de manuseio, durante todo o período até o momento de análise de cada uma delas. Cada processamento ocorreu com triplicata de amostras. As amostras foram filtradas por gravidade em papel filtro por 10 minutos. O produto não foi submetido à centrifugação para que não houvesse interferência da rotação na extração da própolis. Após a filtragem, os extratos foram acondicionados em frasco de vidro âmbar, fechados com batoque e tampa e identificados até o momento da análise, realizada em duplicata para cada triplicata de amostra.

4.2.3.2 Maceração por Agitação

Para o processamento por maceração com agitação, foram utilizadas as amostras de própolis bruta moídas preparadas conforme seção 4.1.1. O solvente (solução etanólica em água 80% v/v) foi adicionado imediatamente antes do processamento e a amostra permaneceu sob agitação (100 rpm) em equipamento Eyela – Mazela-Z pelo período determinado sob chapa a 40 °C, marca Quimis Q 261-22, número de série 878, sob pressão atmosférica (0,1 MPa). Cada processamento ocorreu com triplicata de amostras.

As amostras foram filtradas por gravidade em papel filtro por 10 minutos. O produto não foi submetido à centrifugação para que não houvesse interferência da rotação na extração da própolis. Após a filtragem, os extratos foram acondicionados em frasco de vidro âmbar, fechados com batoque e tampa e identificados até o momento da análise, realizada em duplicata para cada triplicata de amostra.

4.2.4 Extração de Compostos Bioativos da Própolis Verde por Ultrassom

Foram utilizadas as amostras de própolis preparadas conforme seção 4.1.1 para o processamento por ultrassom, porém de cada embalagem de 50 g, utilizou-se 15 g de produto.

O processamento da própolis através da extração assistida por ultrassom foi realizado colocando-se 15 g de amostra de própolis bruta verde e adicionando-se 45 g (54 mL), pesados na mesma balança (Shimadzu, modelo BL3200H), de solvente (mistura etanólica 80%) em béquer encamisado com água a 40 °C (água aquecida pelo banho Marconi, modelo MA184) sob pressão atmosférica (0,1 MPa).

A mistura foi submetida à sonda de ultrassom variando-se inicialmente a potência (de 160 W a 792 W) durante 20 minutos. Após análise de extração relacionada à potência, avaliou-se a eficiência da extração de acordo com o tempo de processamento, sob as mesmas condições. A mistura foi filtrada com papel filtro por 10 minutos por gravidade e armazenada em frascos de vidro âmbar com batoque e tampa até o momento da realização das análises. Cada análise foi realizada em duplicata para cada duplicata de amostra processada.

4.2.5 Análises dos Compostos Bioativos

4.2.5.1 Flavonoides (base Quercetina)

A determinação quantitativa de flavonoides totais, com base em quercetina, foi realizada conforme metodologia descrita por Ikegaki (2001) e Matsuda (2006).

A metodologia baseia-se na formação de complexos estáveis através do cátion Al^+ com os flavonoides em etanol, ocorrendo no ensaio espectrofotométrico um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Desta maneira, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente de ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando-se Nitrato de Alumínio a 10%. Nestas condições, o complexo Flavonoide-Alumínio absorve em comprimento de onda bem maior que o flavonoide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexo com Nitrato de Alumínio, absorvem em comprimento de onda muito inferiores, evitando-se desta maneira interferências nas medidas de absorbância (JURD; GEISSAN, 1956). A figura 8 mostra a complexação do flavonoide com o alumínio.

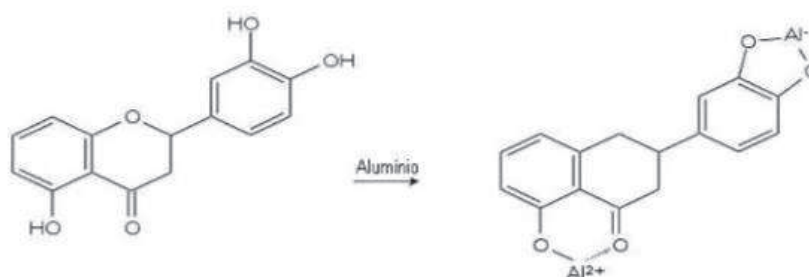


Figura 8: Complexação Flavonoide-Alumínio

Para a curva de calibração, foram preparadas soluções com: 0,01; 0,02; 0,05; 0,10 e 0,20 mg/mL de quercetina utilizando solução de quercetina padrão 1 mg/mL.

Para análise da matéria-prima, utilizou-se o extrato obtido conforme seção 4.2.1.2. Para as análises do extrato obtido por processamento a alta pressão, utilizou-se a metodologia descrita na seção 4.2.2. Para análises dos extratos obtidos através do processamento por maceração estática, maceração com agitação e por ultrassom utilizou-se os procedimentos das seções 4.2.3.1, 4.2.3.2 e 4.2.3.4, respectivamente.

Volume de 0,1 mL foi adicionado a balão volumétrico de 25 mL, completado com etanol 80%. Alíquotas de 0,5 mL desta solução foram transferidas para três balões volumétricos de 5 mL, nos quais foram adicionados 0,1 mL de solução de nitrato de alumínio 10% (para complexação dos flavonoides, exceto na amostra equivalente ao branco) e 0,1 mL de solução de acetato de potássio 1 M (em todos os balões) e avolumados com etanol 80%. Após acondicionamento dos balões em local isento de luz por 40 minutos, as absorbâncias das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV-1700) em comprimento de onda de 415 nm, em cubetas de vidro de 1 cm de caminho óptico. O teor de flavonoides (com base em quercetina) foi a concentração lida multiplicada pela diluição.

4.2.5.2 Compostos Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos totais é baseada no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com padrão ácido gálico. Neste método, ocorre uma reação de óxido-redução, no qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto ocorre a redução do complexo fosfotungstico-fosfomolibdico com aparecimento de coloração azul (cromóforo) que é absorvido a 760 nm.

A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Woisky (1996) e Marcucci (1998).

A curva de calibração foi preparada com solução padrão de ácido gálico 1,0 mg/mL com soluções de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL.

Para análise da matéria-prima, utilizou-se o extrato obtido conforme seção 4.2.1.2. Para as análises do extrato obtido por processamento a alta pressão, utilizou-se a metodologia descrita na seção 4.2.2. Para análises dos extratos obtidos através do processamento por maceração estática, maceração com agitação e por ultrassom utilizou-se os procedimentos das seções 4.2.3.1, 4.2.3.2 e 4.2.3.4, respectivamente.

Volume de 0,1 mL do extrato foi adicionado a balão volumétrico de 25 mL, completado com etanol 80%. Alíquotas de 20 µL desta solução foram transferidas para 3 balões volumétricos de 5 mL e adicionados 0,25 mL de solução de Folin-Ciocalteu (exceto no balão equivalente ao branco). As amostras ficaram estáticas em ambiente escuro por 8 minutos. Após este período, foram adicionados 0,5 mL de solução de carbonato de sódio 10% e ajustado o volume com água destilada. Os balões permaneceram no escuro por 2 horas e a leitura foi então realizada em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV-1700) a 760 nm em cubeta de vidro de 1 cm. O teor de compostos fenólicos totais é a concentração lida multiplicada pela diluição.

4.2.5.3 Artepelin-C

A quantificação de Artepelin-C foi realizada conforme metodologia validada por Matsuda e Almeida-Muradian (2008) com modificações.

Para a calibração da curva, foram utilizadas de 0,6 a 0,25 microlitros/mL de solução padrão de Artepelin-C (0,1 mg/mL em metanol), com fase móvel metanol: água (70:30), isocrático.

Para análise da matéria-prima, utilizou-se o extrato metanólico obtido conforme seção 4.2.1.3. Para as análises do extrato obtido por processamento a alta pressão, utilizou-se a metodologia descrita na seção 4.2.2. Para análises dos extratos obtidos através do processamento por maceração estática, maceração com agitação e por ultrassom utilizou-se os procedimentos das seções 4.2.3.1, 4.2.3.2 e 4.2.3.4, respectivamente.

O extrato foi filtrado em membrana de celulose de 0,45 μm , diluído na solução metanólica 50 vezes e injetado em cromatógrafo líquido modelo SPD-10A da Shimadzu equipado com coluna de fase reversa (C-18 ODS-A, modelo Shimpack CLC-ODS de 150 x 4,6 mm de dimensão com tamanho de partícula de 5 μm) acoplado a um detector ultravioleta (modelo SPD-10AVP com faixa de comprimento de onda de 190 – 600 nm) operando a 275 nm, duas bombas (modelo LC-10AVP), degaseificador de membrana (modelo DGU-12A), sistema de integração e sistema de injeção manual.

O volume de injeção foi de 20 microlitros, à temperatura de 50 °C com vazão de 1,2 mL/minuto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Química da Matéria-Prima

5.1.1 Teor de Umidade

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001), a própolis *in natura* deve apresentar teor de umidade máximo de 8%. A amostra utilizada como matéria-prima nos experimentos, proveniente da região sul de Minas Gerais, apresentou teor de umidade de 2,5%, portanto, de acordo com a legislação brasileira. Sendo um valor baixo, não exerce maior influência na extração e na quantificação dos compostos bioativos.

Matsuda (2008) analisou 33 amostras de diferentes regiões do Brasil e encontrou teores de umidade entre 2,26 e 9,89%, avaliando, portanto, amostras com teores de umidade próximos ao encontrado no presente estudo. Cunha et al. (2004) analisaram o teor de umidade em amostras de própolis de Minas Gerais e obtiveram valores que variaram de 7,8 a 9,6%.

Foram encontrados valores entre 5,75 e 6,30% por Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012) de umidade em cinco amostras colhidas de diferentes cidades de Minas Gerais.

5.1.2 Flavonoides Totais

A extração da própolis bruta para análise de flavonoides totais na matéria-prima seguiu a metodologia descrita na seção 4.2.1.2. O valor de flavonoides totais encontrado na matéria-prima foi de 42,3 mg/g, ou 4,38% em base seca, bem acima do valor mínimo preconizado pela legislação (BRASIL, 2001), que é de 0,5%.

De acordo com Zuanazzi (1999), flavonoides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos devido à abundância relativa no reino vegetal, especificidade em algumas espécies e possibilidade de identificação.

Nas análises de própolis da região sudeste do Brasil, incluindo os estados de Minas Gerais e São Paulo, Matsuda (2008) encontrou valores nas amostras analisadas que variaram entre 0,048 e 6,21% de flavonoides totais com base em quercetina, englobando, portanto, amostras cujos teores de flavonoides eram próximos ao encontrado neste trabalho. Comparando-se com outras regiões do Brasil, observa-se que as própolis provenientes desta região foram as que apresentaram maior teor deste composto. Em amostras coletadas de cinco cidades de Minas Gerais, Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012) encontraram valores entre 43,87 e 49,83 mg/g de flavonoides totais.

5.1.3 Compostos Fenólicos Totais

A extração da própolis bruta para análise de compostos fenólicos totais na matéria-prima seguiu a metodologia descrita na seção 4.2.1.2. O valor encontrado na análise da amostra foi de 95,47 mg/g ou 9,79% em base seca, também acima do valor mínimo estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), que é de 5,0%.

Nas amostras provenientes do estado de Minas Gerais, Matsuda (2008) encontrou valores de compostos fenólicos totais entre 7,89 e 19,43%. Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012) encontravam valores entre 7,89 e 15,75% de compostos fenólicos em própolis proveniente de Minas Gerais. Em ambos os estudos se encontrou grande diferença entre os teores de compostos fenólicos nas amostras, sendo o valor encontrado neste estudo presente no intervalo de variação dos mesmos.

5.1.4 Artepelin-C

A legislação brasileira não estabelece valor para Artepelin-C. A análise deste composto bioativo é utilizada comercialmente como parâmetro de qualidade e refere-se especificamente à própolis proveniente da *Baccharis dracunculifolia*. A própolis bruta foi submetida à análise de Artepelin-C conforme seção 4.2.1.3, apresentando teor de 8,32% (m/m).

Nas análises de Artepelin-C realizadas nas amostras coletadas da região de Minas Gerais por Matsuda (2008), foram encontrados valores que variaram entre 5,68 e 10,20%. O teor médio de Artepelin-C das amostras de própolis provenientes da região sudeste avaliadas por Park et al. (2004) foi de 3,8%. Shimidzu et al. (2004) analisaram amostras de própolis provenientes de Minas Gerais e encontraram teor médio de 4,0% de Artepelin-C. Fernandes-Silva et al. (2013) analisaram cinco amostras colhidas de duas cidades de Minas Gerais e encontravam valores entre 1,91 e 5,13% de Artepelin-C. Observa-se, portanto, que teor de Artepelin-C da amostra utilizada no presente estudo está acima da média em comparação com os estudos citados.

5.2 Extração em Alta Pressão

5.2.1 Análise de Flavonoides Totais, Compostos Fenólicos Totais e Artepelin-C dos Extratos Obtidos por Alta Pressão

As Figuras 9, 10 e 11 mostram o teor de flavonoides do extrato (mg/mL), o teor de compostos fenólicos totais (mg/mL) e o teor de Artepelin-C (%), respectivamente, obtidos nos processamentos com diferentes pressões, mantendo-se os demais parâmetros constantes: temperatura de 40 °C, relação sólido: solvente de 1:2 massa/massa e tempo de 1 minuto, comparando-se com os teores obtidos através

das tecnologias convencionais (maceração estática – em dias e agitação – em horas), na mesma temperatura e relação sólido: solvente.

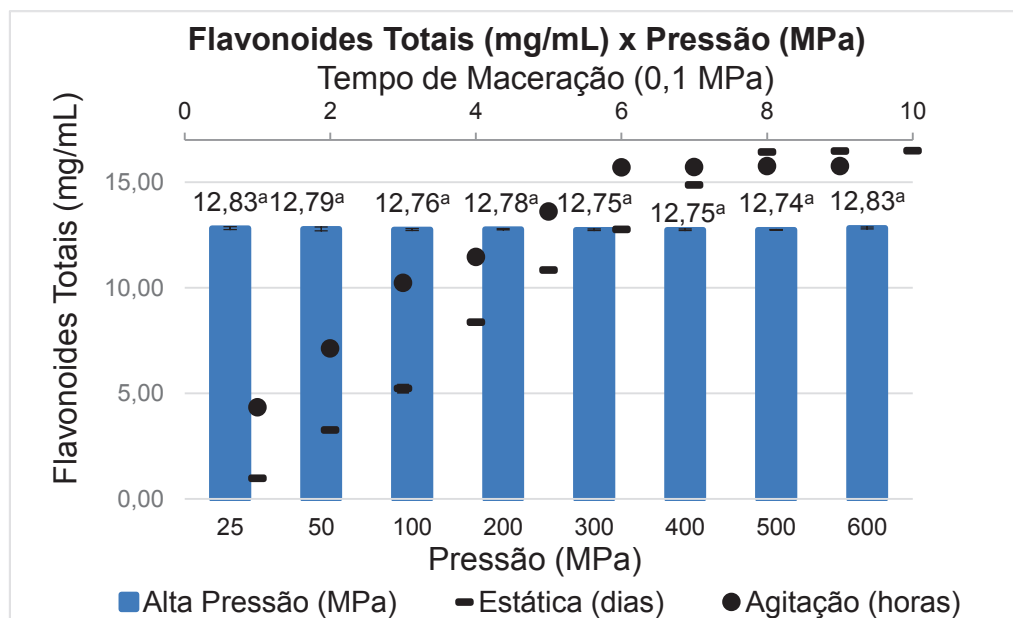


Figura 9: Flavonoides totais (mg/mL) dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.

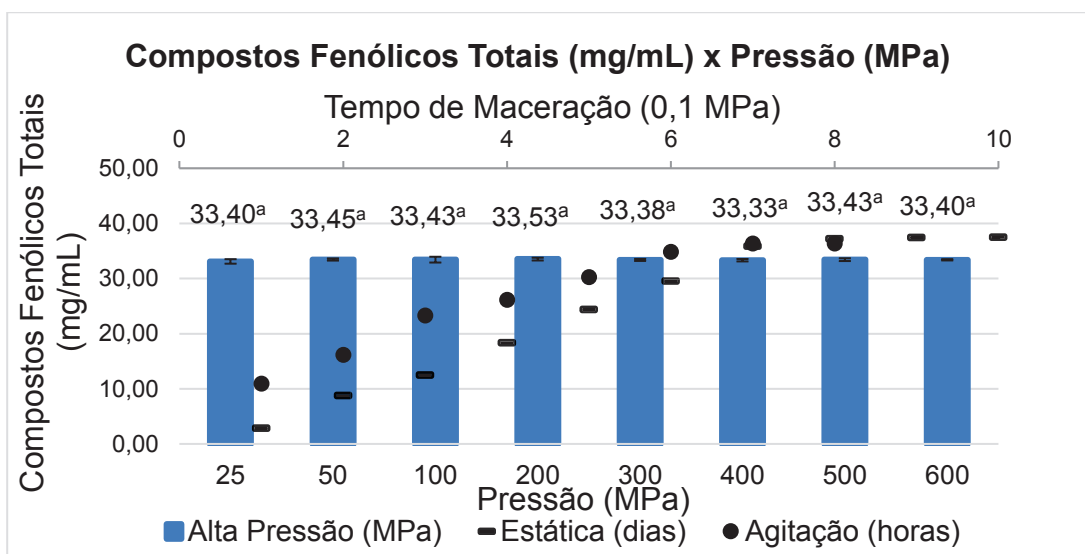


Figura 10: Compostos fenólicos totais (mg/mL) dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.

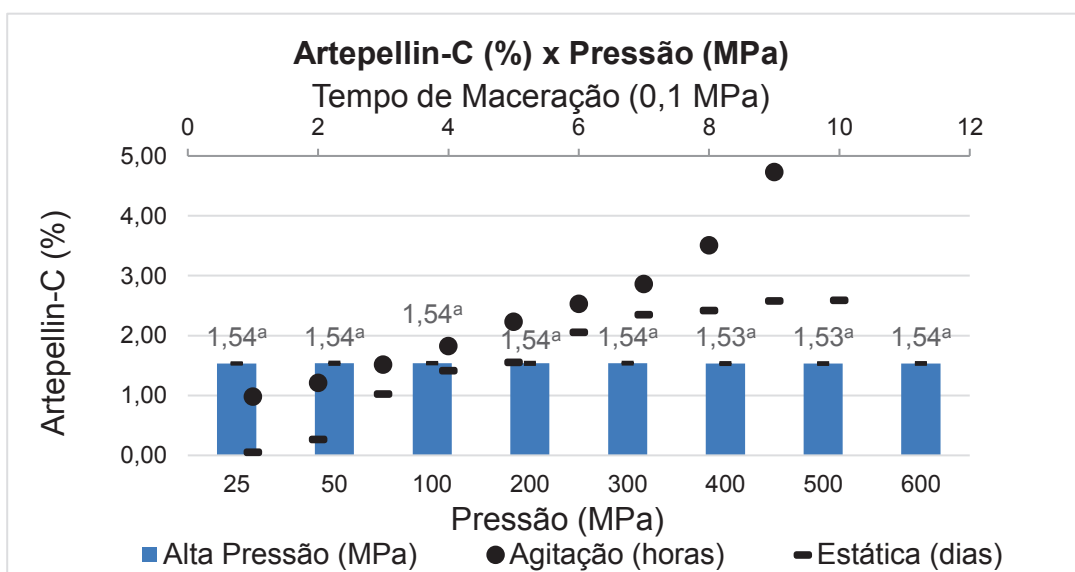


Figura 11: Artepellin-C (%) dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.

Observou-se pelas Figuras 9, 10 e 11 que tanto para flavonoides totais, quanto compostos fenólicos totais e Artepellin-C, houve pequenas variações nos teores encontrados nas pressões de 25 a 600 MPa. A análise estatística revelou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na extração dos compostos entre os processos com pressão acima da 0,1 MPa (tabelas 3, 4 e 5 - anexo B).

Através da Tabela 5 (anexo B), observou-se que os teores de flavonoides totais obtidos com o uso da tecnologia de alta pressão por um minuto não possuem diferença significativa ($p < 0,05$) com o teor obtido após 6 dias de maceração estática e corresponde ao teor que seria obtido após maceração por agitação entre 4 e 5 horas, tornando promissora a continuidade dos estudos.

Para compostos fenólicos totais, a Tabela 6 (anexo B) mostrou que a extração aumenta até o oitavo dia por maceração estática. Entre o sexto e sétimo dia de extração, o teor obtido corresponde à extração obtida por tecnologia de alta pressão isostática por um minuto. Para maceração por agitação, o teor aumenta até a sétima hora e o valor obtido através de tecnologia de alta pressão isostática corresponde ao obtido entre 5 e 6 horas de agitação.

Através da Tabela 7 (anexo B) observou-se que o teor de Artepellin-C obtido por tecnologia de alta pressão isostática não possui diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos teores obtidos em 5 dias de maceração estática e 3 horas de maceração por agitação.

No estudo de Shouqin, Jun e Changzeng (2005), foi analisado o efeito da pressão de 100 a 600 MPa na extração de compostos da própolis da China e a pressão que demonstrou eficiência foi de 500 MPa, apresentando um efeito crescente na extração de flavonoides da própolis local entre as pressões de 100 e 500 MPa por 1 minuto, na relação sólido: solvente (etanol 70%) de 3:10 (m/v) em temperatura ambiente.

Uma vez que não foi observado o aumento da extração dos compostos bioativos da própolis com o aumento da pressão, optou-se por avaliar a influência do tempo na extração da própolis sob a menor pressão (25 MPa), pois quanto maior a pressão de processamento, maiores investimentos em equipamento e energia são requeridos.

A Figura 12 apresenta os teores de flavonoides totais, compostos fenólicos totais e Artepellin-C obtidos nos processamentos por alta pressão isostática em tempos de 1, 3 e 5 minutos, sob pressão de 25 MPa, a 40 °C, mantendo-se a mesma relação sólido: solvente (01: 02 m/m).

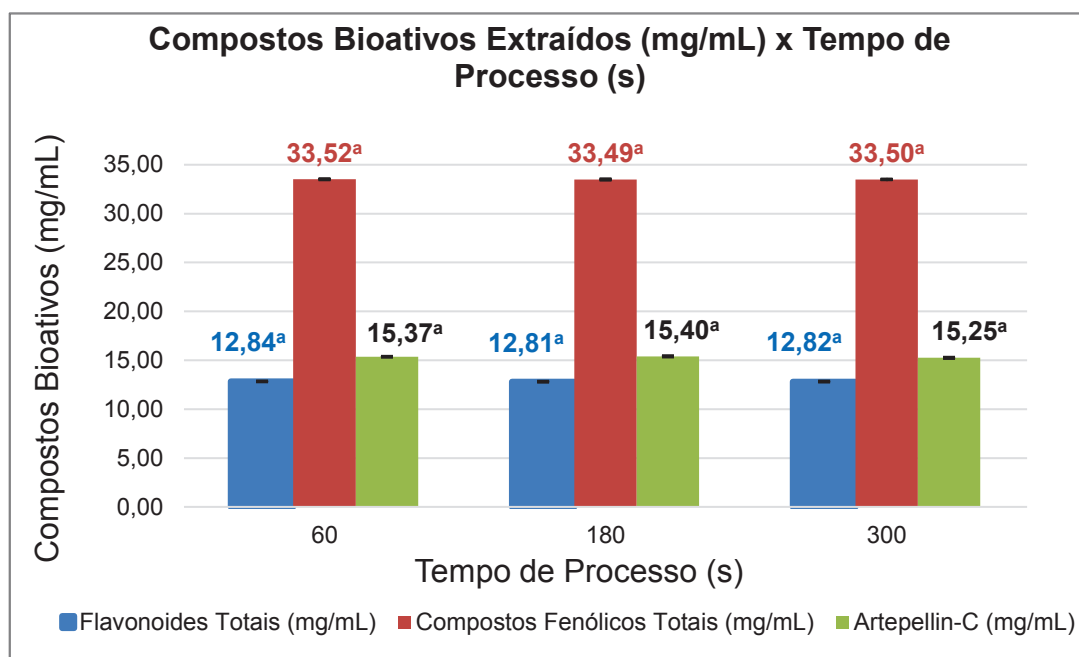


Figura 12: Teores de Compostos Bioativos (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se o tempo, submetido à pressão de 25 MPa a 40 °C e relação sólido solvente 1:2 (m/m). Letras em azul representam a análise estatística entre os processamentos para flavonoides totais, letras em vermelho para compostos fenólicos totais e em preto para Artepellin-C.

A Figura 12 mostra que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na extração dos compostos estudados com o aumento do tempo de processo na pressão de 25 MPa sendo o tempo de 60 segundos suficiente para extração dos compostos comparando-se com os tempos de 180 e 300 segundos. Sendo assim, optou-se por estabelecer este binômio para avaliar a influência da temperatura no processamento por alta pressão.

Shouqin, Jun e Changzeng (2005), estudando a extração de compostos bioativos de própolis da China, também avaliaram que o tempo de 1 minuto foi suficiente para a extração em comparação com tempos de 4, 7 e 10 minutos, a 400 e 500 MPa, obtendo-se valores entre 4,5 e 5,0% de flavonoides (base rutina) para as

pressões de 400 e 500 MPa, na relação sólido:solvente de 1:20 m/v em etanol 75% (v/v).

A Figura 13 apresenta os teores de compostos bioativos obtidos no processamento por alta pressão a 25 MPa e tempo de 1 minuto, variando-se a temperatura de processo. As temperaturas definidas foram de 20, 60 e 80 °C, para comparação com a extração realizada anteriormente, a 40 °C.

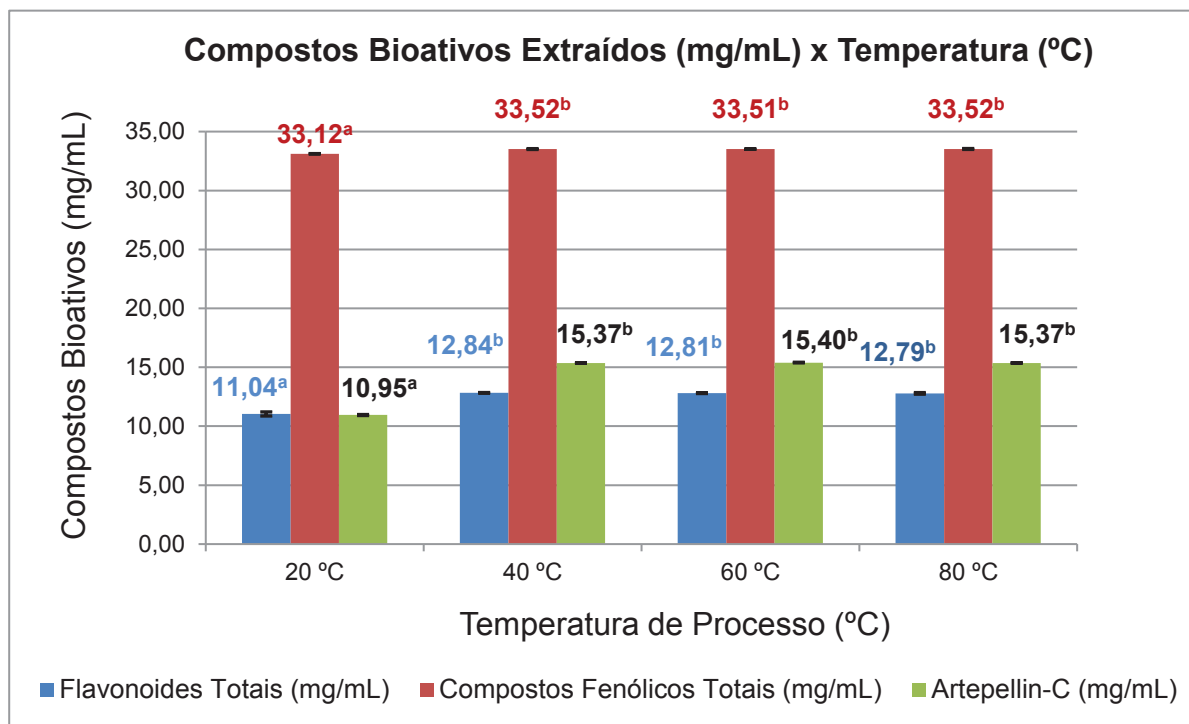


Figura 13: Compostos Bioativos (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se a temperatura em processamento por alta pressão isostática a 25 MPa por 1 minuto. Letras em azul representam a análise estatística entre os processamentos para flavonoides totais, letras em vermelho para compostos fenólicos totais e em preto para Artepellin-C.

Através da Figura 13 observou-se que, variando a temperatura de processamento, houve diferença estatística ($p < 0,05$) no teor de flavonoides, compostos fenólicos e Artepellin-C extraídos da própolis. Nos três casos a extração é aumentada entre 20 e 40 °C mantendo-se constante a 60 °C e 80 °C.

O uso da temperatura mais baixa influenciou negativamente na extração dos compostos bioativos, enquanto entre 40 e 80 °C não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na extração.

Hsu (2008) estudou a concentração de carotenoides totais e licopeno em suco de tomate através do uso da tecnologia de alta pressão isostática. A partir de 300 MPa e temperaturas baixas (4 e 25 °C), houve elevação de 62% de carotenoides totais e de 56% de licopeno. Porém, em temperaturas acima de 50 °C houve redução destes compostos.

Considerando os resultados apresentados, optou-se por padronizar os parâmetros de processo, como segue: pressão a 25 MPa, tempo de 60 segundos e temperatura de 40 °C para o processamento de amostras com diferentes relações de sólido: solvente (1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 m/m), a fim de avaliar a influência desta relação na extração de flavonoides totais, compostos fenólicos e Artepelin-C.

Para comparativo e análise estatística, os teores de flavonoides totais e compostos fenólicos extraídos foram padronizados para quantidade por grama de própolis bruta utilizada e o teor de Artepelin-C, multiplicado pela razão de solvente.

A figura 14 representa o teor de compostos bioativos extraídos em mg de composto bioativo/g de própolis.

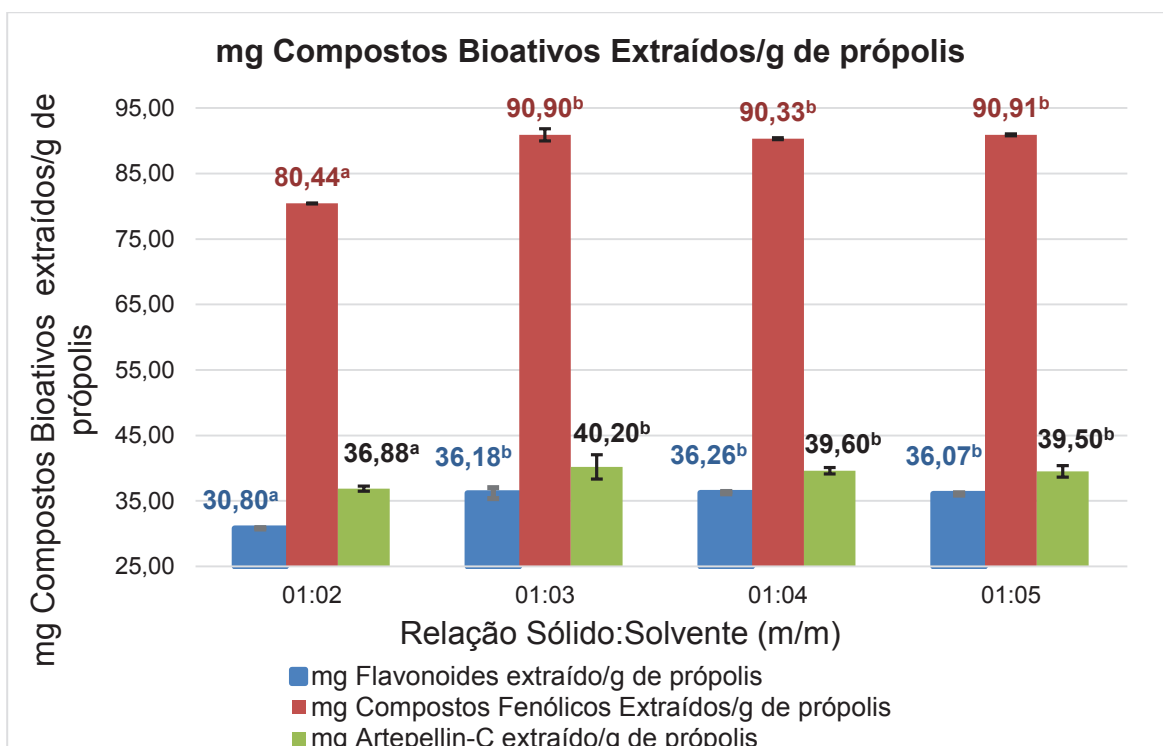


Figura 14: Compostos Bioativos (mg/g) dos extratos obtidos variando-se a razão sólido: solvente (1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 m/m) sob pressão de 25 MPa, tempo de 60 segundos e temperatura de 40 °C. Letras em azul representam a análise estatística entre os processamentos para flavonoides totais, letras em vermelho para compostos fenólicos totais e em preto para Artepellin-C.

Observou-se através do figura 14 que houve diferença na eficiência da extração de flavonoides totais, compostos fenólicos totais e Artepellin-C variando-se a relação sólido: solvente, sendo mais viável a utilização de solvente 3 vezes ou acima em relação à quantidade de sólidos.

A avaliação da influência da relação sólido: solvente na extração de própolis chinesa, entre as razões 01:05 e 01:45 foram avaliadas por Shouqin, Jun e Changzeng (2005). O melhor resultado obtido para a extração de flavonoides da própolis da China foi de $5,10 \pm 0,14$ % (m/m) com a utilização da razão de 01:35 a 500 MPa por um minuto em temperatura ambiente. O valor obtido foi maior comparando com o presente estudo, porém a metodologia de análise utilizada na China é diferente da preconizada para própolis brasileira, impossibilitando a devida comparação. A utilização desta proporção de solvente não seria recomendável neste estudo devido ao uso de uma quantidade maior de própolis e capacidade volumétrica limitada da câmara, além de questões econômicas e ambientais devido à maior quantidade de solvente utilizada.

Portanto, para a avaliação e comparativo com a maceração estática, maceração com agitação e processamento assistido por ultrassom, foi utilizada a relação sólido: solvente de 1:3 (m/m) e processaram-se, sob pressões de 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 MPa por 60 segundos a 40 °C, concluída como a relação com maior eficiência de extração.

5.3 Cinética da Extração Convencional – estática e com agitação

Para comparação do processamento de extrato de própolis por alta pressão utilizando-se as variáveis de tempo, temperatura, pressão e relação sólido: solvente mais eficientes com os métodos de extração convencional nas mesmas variáveis em pressão atmosférica, analisou-se diariamente amostras de própolis submetidas à maceração estática e maceração com agitação e avaliou-se a cinética de extração de Flavonoides, Compostos Fenólicos e Artepelin-C, conforme os gráficos das Figuras 15, 16 e 17:

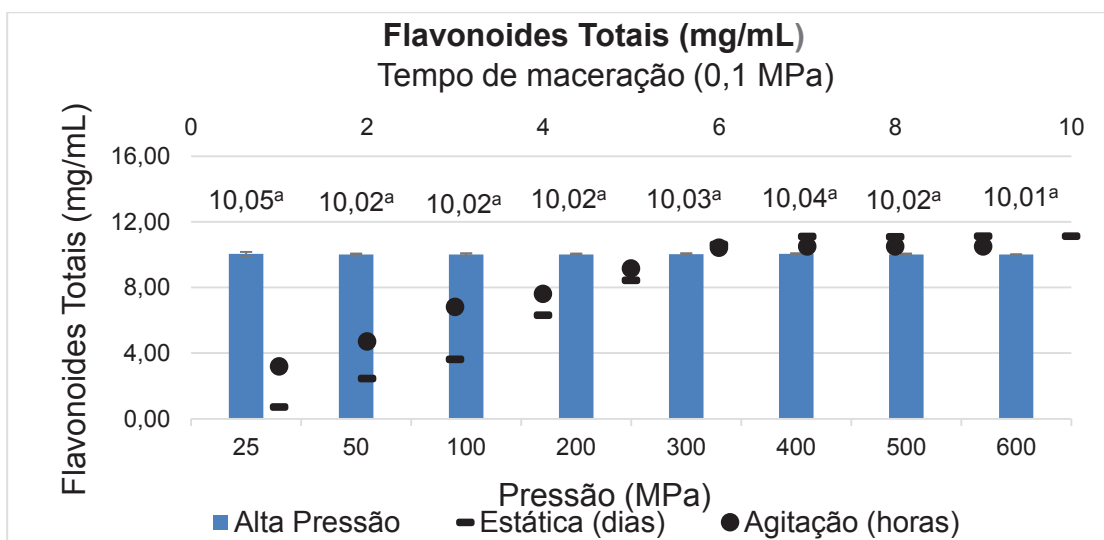


Figura 15: Comparação da extração de flavonoides totais (mg/mL) obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.

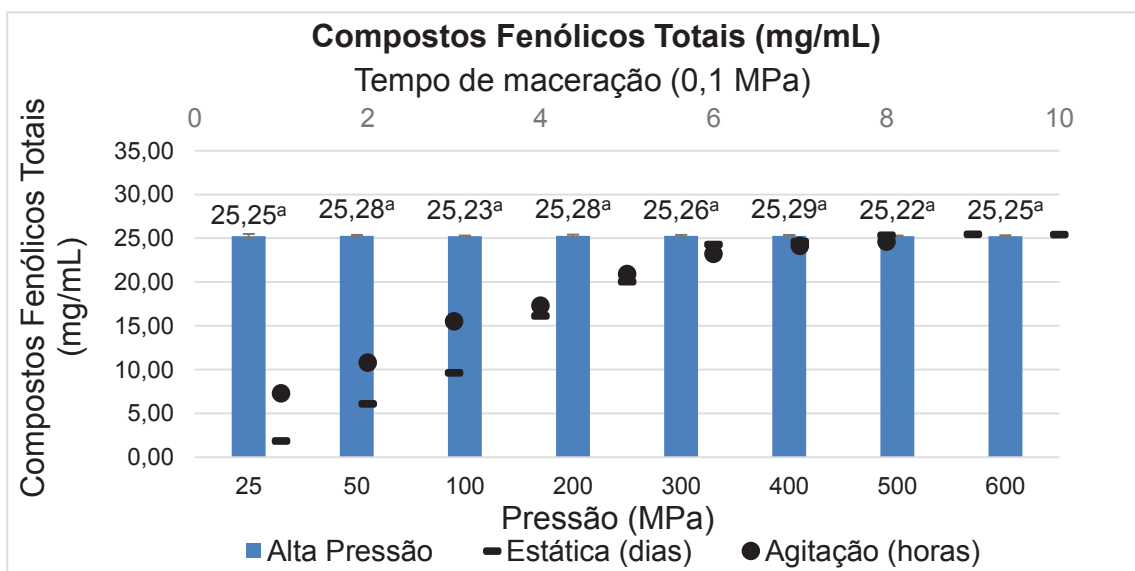


Figura 16: Comparação da extração de compostos fenólicos totais (mg/mL) obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.

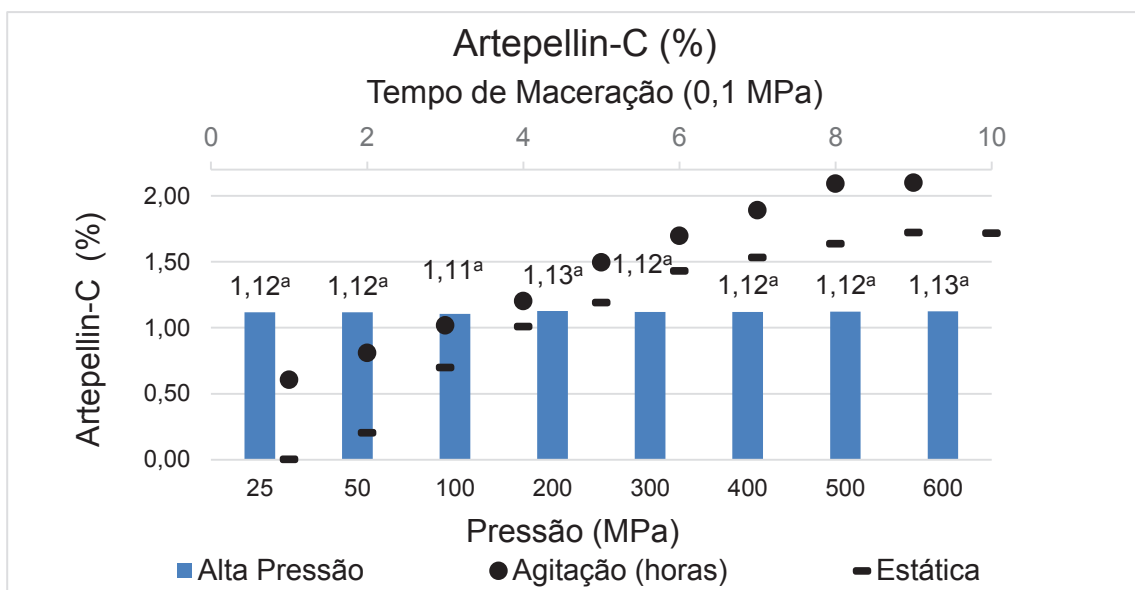


Figura 17: Comparação da extração de Artepelin-C (%) obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes pressões por alta pressão isostática.

As Figuras 15, 16 e 17 confirmaram que os extratos de própolis obtidos por tecnologia de alta pressão isostática não tiveram os teores de compostos bioativos aumentados com o aumento de pressão (entre 25 e 600 MPa), mesmo com a alteração da relação sólido: solvente, de 1:2 para 1:3 (m/m).

Observou-se na Tabela 8 (anexo C) que o aumento do teor de flavonoides totais (mg/mL) ocorre até o sétimo dia para maceração estática e até a sexta hora para maceração com agitação, não havendo diferença significativa na extração após estes períodos. Os teores deste composto bioativo obtidos através da tecnologia de alta pressão isostática correspondem aos teores obtidos entre o 5º e 6º dia de maceração estática e entre a 5ª e 6ª hora de maceração por agitação.

Através da Tabela 9 (anexo C), observou-se que para compostos fenólicos totais, a extração pelo uso de tecnologia de alta pressão isostática corresponde à extração obtida entre 7 e 8 dias de maceração estática. Em relação à maceração com agitação, em um minuto foi extraído teor maior que 8 horas de processamento.

Observou-se pela Tabela 10 (anexo C) que para Artepelin-C, não há diferença significativa do teor obtido através da tecnologia de alta pressão (25 MPa/1 minuto) - nas mesmas condições de temperatura e relação sólido: solvente – com os teores obtidos após 5 dias de maceração estática e 4 horas de agitação (100 rpm).

Após 10 dias de maceração estática com uma agitação diária manualmente, na relação sólido: solvente de 01:05 (massa/volume), com o solvente de graduação alcoólica de 80%, Buriol (2008) extraiu 5,21% de compostos fenólicos e 2,24% de flavonoides da própolis bruta.

Na avaliação da extração de flavonoides de própolis da China por alta pressão em comparação com a maceração à temperatura ambiente, Shouqin, Jun e Changzeng (2005), observaram a equivalência na extração de flavonoides de própolis no processamento por 1 minuto por alta pressão (500 MPa) e 7 dias em maceração em temperatura ambiente, com agitação manual de uma vez ao dia, obtendo os teores de $5,10 \pm 0,14$ % (m/m) e $4,70 \pm 0,21$ % (m/m) de flavonoides totais, respectivamente.

Alves e Kubota (2013) analisaram o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de extratos de própolis comerciais adquiridas em farmácias do Rio Grande do Sul e encontraram valores de 0,71 a 5,39 mg/g de extrato de compostos fenólicos totais e de 0,049 a 1,15 mg/g de extrato de flavonoides totais.

Observou-se que a extração dos compostos bioativos de própolis por alta pressão isostática nas mesmas condições de temperatura (40 °C) e relação sólido: solvente (1:3 m/m) demanda muito menos tempo que a extração através dos métodos convencionais (maceração estática e maceração com agitação). O tempo requerido foi de um minuto, assim como no estudo de Shouqin, Jun e Changzeng (2005), com uma pressão bem menor (25 MPa) em relação à estudada por estes pesquisadores (500 MPa).

De acordo com Yang et al (2009), a alta pressão causa alterações na morfologia e estrutura celular, causando danos à membrana celular, que por sua vez, torna-se mais permeável. A concentração entre o interior das células e exterior das membranas celulares atinge então o equilíbrio rapidamente (teoria da transferência de massa). Provavelmente devido à maior permeabilidade da membrana celular, obteve-se a

extração dos compostos bioativos em menor tempo no processamento por alta pressão em relação aos processos convencionais de maceração.

5.4 Extração por Ultrassom

No processamento de extrato de própolis assistido por ultrassom, inicialmente, avaliou-se o efeito da potência do ultrassom na extração de flavonoides, compostos fenólicos e Artepelin-C da própolis. O sistema de ultrassom possui potência máxima de 800 W, havendo a possibilidade de ajustar a potência de 1 a 99% da potência especificada. Sendo assim, utilizou-se a mesma relação sólido: solvente utilizada no processamento por alta pressão (1:3 m/m), a mesma temperatura (40 °C, utilizando-se béquer encamisado) e determinou-se o tempo de 20 minutos, variando-se a potência de 20 a 99% da potência máxima especificada (160 a 792 W).

As Figuras 18, 19 e 20 mostram, respectivamente, os valores de flavonoides totais (mg/mL), compostos fenólicos totais (mg/mL) e Artepelin-C (%) encontrados durante o processamento com variação de potência, em comparação com os processamentos por maceração estática e com agitação.

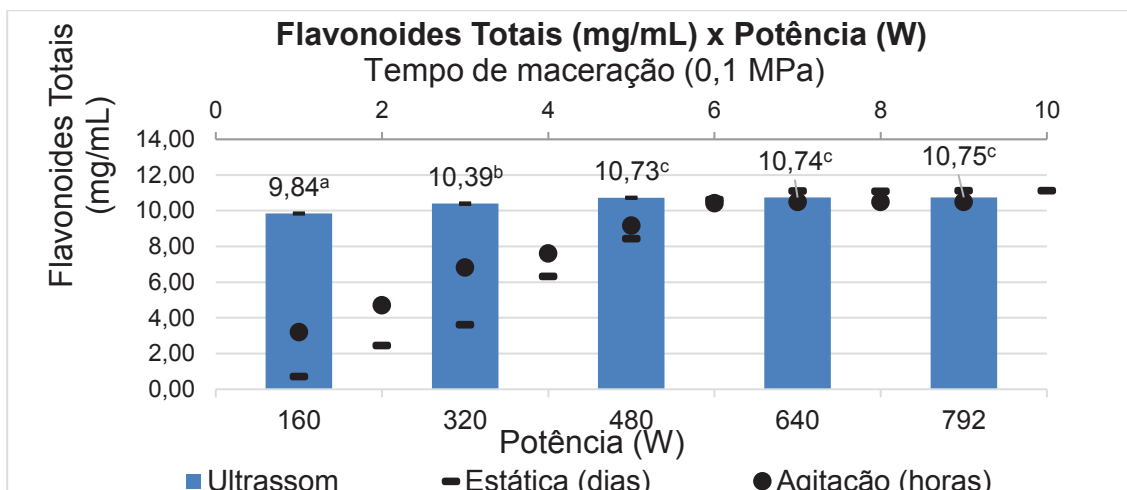


Figura 18: Flavonoides Totais dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes potências por ultrassom.

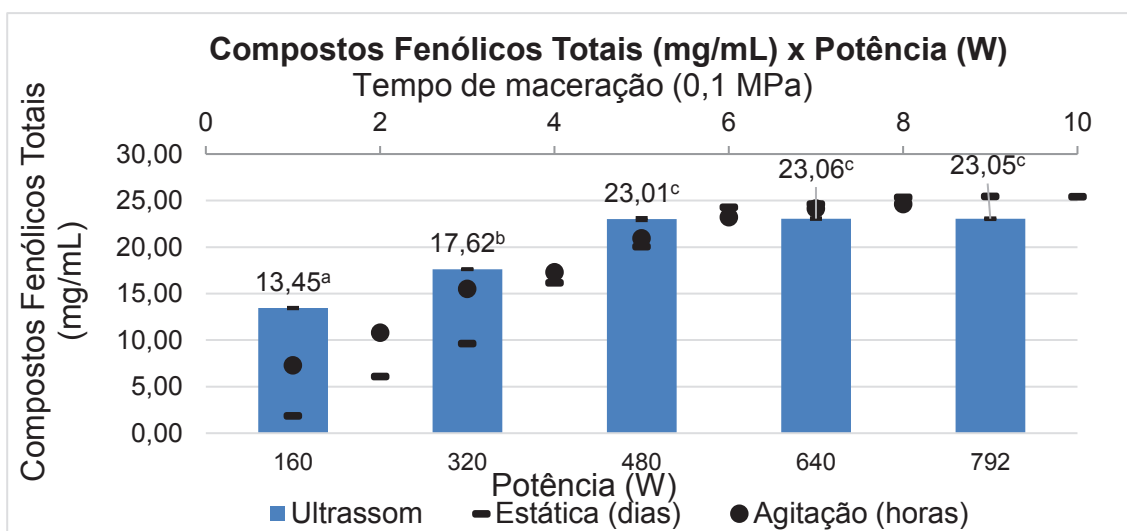


Figura 19: Compostos Fenólicos Totais dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes potências por ultrassom.

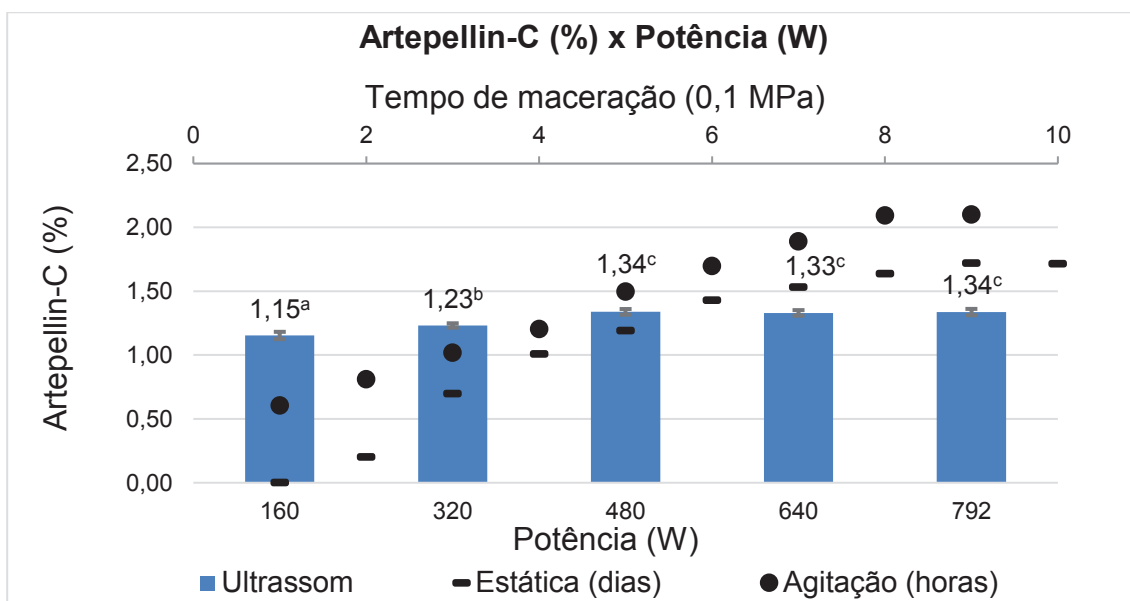


Figura 20: Artepellin-C dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes potências por ultrassom.

Observou-se pelas Figuras 18,19 e 20 que tanto para flavonoides totais, quanto compostos fenólicos totais e Artepellin-C, houve aumento da extração por 20 minutos aumentando-se a potência de 20 a 60% (de 160 a 480 W).

Através das análises estatísticas ($p < 0,05$) observadas nas Tabelas 11, 12 e 13 (anexo D), concluiu-se que a utilização de 60% da potência total é suficiente para extrair os compostos bioativos da própolis nas condições de processamento utilizadas, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) na extração devido ao aumento de potência entre 480 W e 792 W.

Observou-se através das análises estatísticas das Tabelas 11, 12 e 13 (anexo D) que amostras submetidas à potência de 480 W por 20 minutos obtiveram o teor de flavonoides correspondente ao teor obtido entre 6 e 7 dias de maceração estática e maior que 9 horas de agitação, teor de compostos fenólicos maior que em 5 dias de maceração estática e correspondente a 6 horas com agitação ($p < 0,05$) e o teor de Artepellin-C maior que 5 dias de maceração estática e entre 4 e 5 horas de agitação.

Portanto, procedeu-se com os testes de processamento por ultrassom determinando-se a potência de 60% (480 W) e alterando-se o tempo de processamento. As amostras então foram processadas, para os tempos de 10, 20, 40 e 60 minutos, mantendo-se os parâmetros de temperatura (40 °C), relação sólido: solvente (1:3 m/m) e potência (480 W).

A Figura 21 apresenta os resultados para flavonoides totais dos extratos obtidos sob as condições descritas.

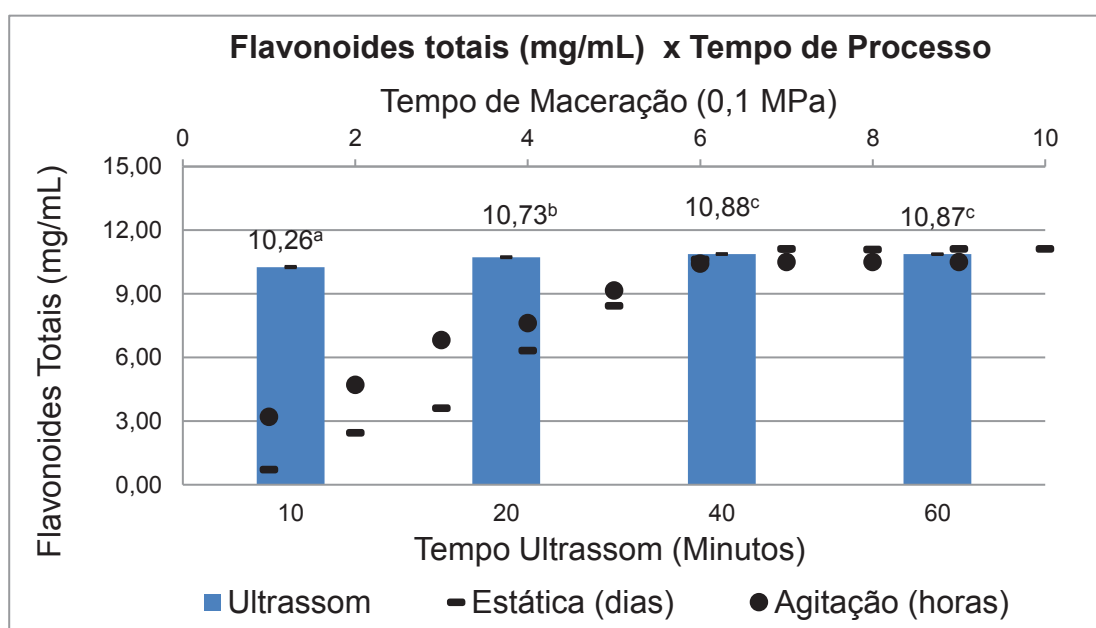


Figura 21: Flavonoides Totais dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom.

A Figura 21 mostrou que o teor de flavonoides totais dos extratos obtidos por ultrassom a 480 W aumenta de acordo com o tempo de processamento até o tempo de 40 minutos, não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre 40 e 60 minutos de processamento.

A Tabela 14 (anexo E) mostrou que teor de flavonoides totais (mg/mL) obtido no extrato após 40 minutos no ultrassom nas condições descritas corresponde ao teor obtido entre 6 e 7 dias de maceração estática e maior que 9 horas de agitação.

No estudo de Kasha-ananda et al. (2013), utilizando própolis da China, com etanol 70% como solvente na relação de 1:10 (m/v) de sólido: solvente, em banho de ultrassom por 30 minutos, foi obtido o teor de 20,49 mg/g de flavonoides totais, valor 10% superior ao teor obtido através da maceração convencional por 72 horas.

Kothai e Jayanthi (2014) estudaram própolis indiana extraída com solvente etanol 70 % na relação sólido: solvente 1:10 submetida a banho de ultrassom por 3 horas e encontraram o valor de 6,0 mg/g de flavonoides totais.

No estudo de extração de “poplar propolis” (tipo europeia), Trusheva, Trunkova e Bankova (2007) não realizaram análise de flavonoides totais, porém, para flavonas e flavonois, no processamento por tempo de 30 minutos em banho de ultrassom a 300 W, obtiveram 0,96 mg/g destes compostos, correspondente a 9% a mais que na maceração convencional por 72 horas.

A Figura 22 apresenta os resultados para compostos fenólicos totais (mg/mL) dos extratos obtidos para os tempos de 10, 20, 40 e 60 minutos, mantendo-se os parâmetros de temperatura (40 °C), relação sólido: solvente (1:3 m/m) e potência (480 W) no ultrassom.

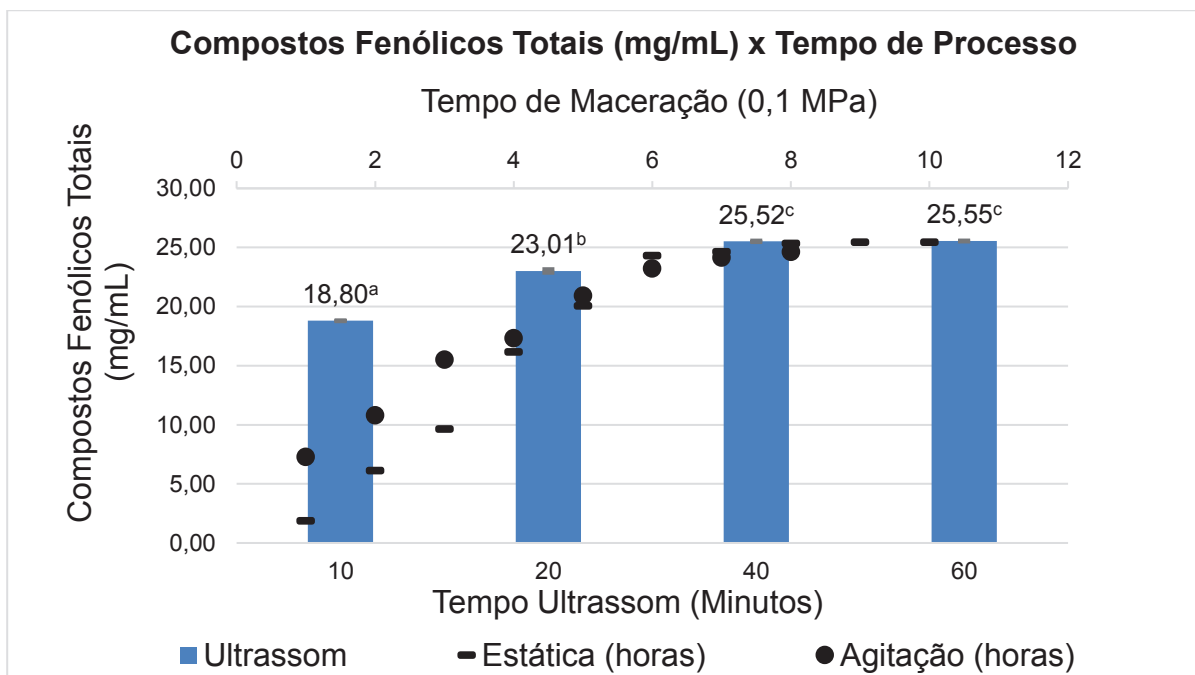


Figura 22: Compostos Fenólicos Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom.

Observou-se na Figura 22 que o teor de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos por ultrassom a 480 W aumenta de acordo com o tempo de processamento até o tempo de 40 minutos, não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre 40 e 60 minutos de processamento.

Através da Tabela 15 (anexo E) verificou-se que o teor de compostos fenólicos totais obtidos por ultrassom a 480 W e 40 minutos superou os teores obtidos por maceração estática por 10 dias e maceração com agitação por 8 horas.

Kacha-ananda et al. (2013) obtiveram 18,3 mg/g de compostos fenólicos processando amostra de própolis chinesa com relação de 1:10 (m/v) sólido: solvente (etanol 70%) em banho de ultrassom por 30 minutos a 25 °C, enquanto por maceração convencional (72 horas), o teor obtido foi de 17,17 mg/g.

No estudo de Kothai e Jayanthi (2014), utilizando própolis indiana, foi encontrado o teor de 0,15 mg/mL de compostos fenólicos totais no extrato obtido por banho de ultrassom processado por 3 horas.

Trusheva, Trunkova e Bankova (2007) verificaram que para a extração de própolis europeia, o tempo de 30 minutos em banho de ultrassom a 300 W foi suficiente para a extração de compostos fenólicos, encontrando o valor de 5,3 mg/g de extrato, enquanto na maceração convencional por 72 horas encontrou 4,3 mg/g, na mesma relação de sólido: solvente (1:10 etanol 70%).

A Figura 23 apresenta os resultados para Artepelin-C (%) dos extratos obtidos para os tempos de 10, 20, 40 e 60 minutos, mantendo-se os parâmetros de temperatura (40 °C), relação sólido: solvente (1:3 m/m) e potência (480 W) no ultrassom.

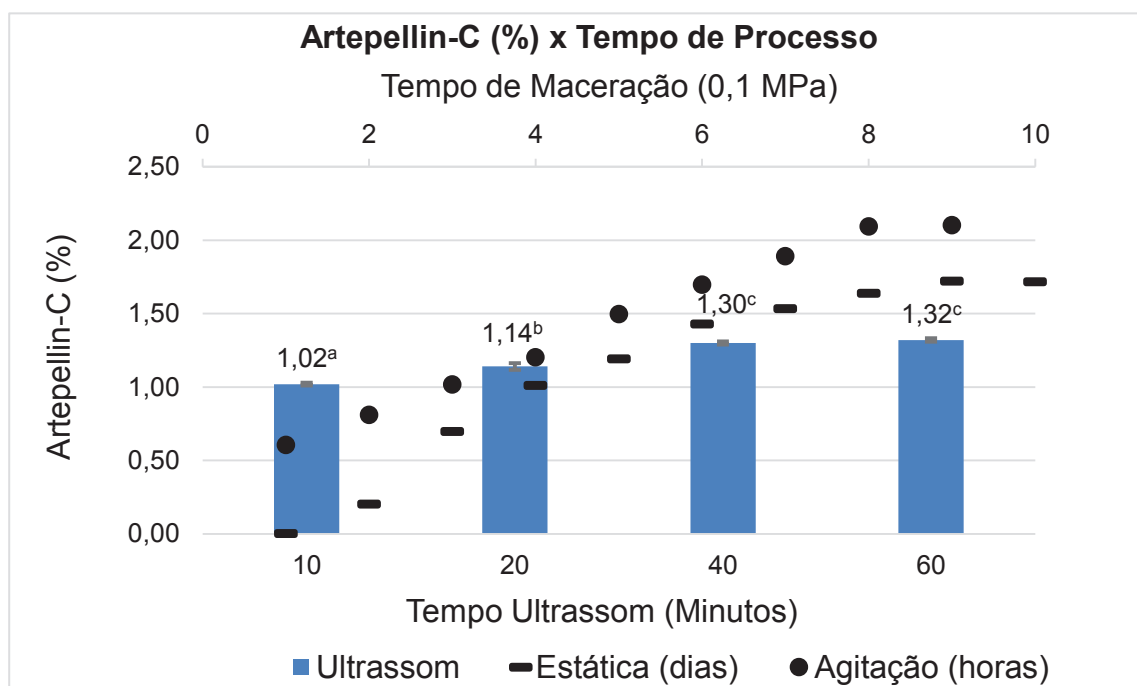


Figura 23: Artepelin-C (%) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m). Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom e letras diferentes significam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas ao processamento em diferentes tempos por ultrassom.

Os resultados foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$) e através da Figura 23 observou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao processar as amostras por 60 minutos em relação ao tempo de 40 minutos para Artepelin-C, assim como ocorreu para flavonoides totais e compostos fenólicos. Portanto, na relação sólido: solvente de 1:3 (m/m), a 40 °C, a potência de 480 W e o tempo de 40 minutos mostraram-se eficientes para a extração dos compostos bioativos da própolis por ultrassom.

Observou-se através da tabela 16 (anexo E) que o teor de Artepelin-C obtido por ultrassom nas melhores condições encontradas corresponde ao teor obtido entre 6 e 7 dias de maceração estática e entre 4 e 5 horas de maceração com agitação.

De acordo com Meireles (2008), no processamento por ultrassom, o colapso das bolhas causa cavitação. A área de superfície de contato entre o solvente e os compostos bioativos é aumentada, aumentando assim a taxa de transferência de massa. O fluido também produz ondas de choque, que criam turbulência microscópica nas películas interfaciais no sólido, fenômeno conhecido como “microstreaming”, aumentando também a transferência de massa através do filme.

Assim como no estudo de Trusheva et al (2007), o colapso das bolhas produzidas provavelmente foi o que potencializou a extração da própolis, especialmente de flavonoides e de compostos bioativos, que superou o valor máximo encontrado na extração por maceração por agitação. Foi necessário tempo (40 minutos) para se obter maior permeabilidade das paredes celulares, tempo menor que encontrado pelos pesquisadores (1 hora e 40 minutos).

A Tabela 4 apresenta o comparativo da extração de flavonoides totais, compostos fenólicos totais e Artepelin-C da própolis por maceração estática e com agitação com o processamento por alta pressão e ultrassom nas condições que demonstraram maior eficiência de extração dos compostos bioativos.

Tabela 4: Comparativo da Extração de Compostos Bioativos nas condições de extração de maior eficiência das tecnologias

Processo	Flavonoides Totais* (mg/mL)	Compostos Fenólicos Totais (mg/mL)	Artepellin-C (%)
Alta Pressão (25 MPa, 1 minuto)	10,05 ^a ± 0,13	25,25 ^b ± 0,26	1,12 ^a ± 0,05
Ultrassom (480 W, 40 minutos)	10,88 ^c ± 0,03	25,52 ^c ± 0,06	1,30 ^b ± 0,01
Maceração Estática (*)	11,10 ^d ± 0,05	24,60 ^a ± 0,09	1,72 ^c ± 0,03
Maceração Agitação (100 rpm ^{**})	10,42 ^b ± 0,05	24,61 ^a ± 0,03	2,10 ^d ± 0,04

* Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de compostos bioativos obtidos das amostras submetidas aos diferentes processamentos

** 7 dias para flavonoides e compostos fenólicos totais e 9 dias para Artepellin-C

*** 6 horas para flavonoides totais, 8 horas para compostos fenólicos totais e 9 horas para Artepellin-C

Apesar dos teores de compostos bioativos extraídos no processamento por alta pressão terem sido menores em relação ao processamento por ultrassom e por macerações convencionais (exceto para compostos fenólicos totais), o tempo requerido para a extração foi bem menor (1 minuto), provavelmente pelas células pressurizadas terem suas paredes rompidas, ocasionando maior eficiência na permeabilidade do solvente na própolis.

No presente estudo, comparou-se a extração de compostos bioativos da própolis bruta através das diferentes tecnologias com sua granulometria padronizada e obteve-se em um minuto de extração por tecnologia de alta pressão isostática teores de compostos bioativos nos extratos de própolis equivalentes a processamentos convencionais demandando horas ou dias. Em escala industrial, seria despendido tempo para esta padronização de granulometria (moagem e peneiragem) e, portanto, em processos convencionais, há heterogeneidade do tamanho dos pedaços de própolis bruta a ser macerada, pois o produto é colocado diretamente em solvente, não havendo pré-processamento. Neste caso, a tecnologia de alta pressão isostática torna-se uma alternativa e há possibilidade de a diferença na extração entre os processos ser maior. É possível também que haja necessidade de utilização de menor quantidade de solvente em relação aos processos convencionais, já que em pedaços

maiores, a própolis teria baixa eficiência no empacotamento e haveria necessidade de maior quantidade de solvente para a maceração.

Para Artepellin-C observou-se maior extração nos processamentos convencionais (maceração estática e por agitação) após 9 dias e 9 horas de processo, respectivamente. São necessários estudos futuros para a compreensão da extração deste composto, o mais valorizado pelo mercado mundial, pois o aumento de tempo nos processamentos por alta pressão e por ultrassom não influenciou na extração, ao contrário do que ocorreu nos processamentos por maceração convencionais.

Não foi observado, no presente estudo, alteração no rendimento de extrato obtido em volume entre o uso das diferentes tecnologias, já que a filtração foi realizada por gravidade. A centrifugação não foi utilizada como forma de separação de fases anteriormente à filtração para não haver interferência da rotação na extração dos compostos bioativos. Para avaliação de rendimento em futuros estudos, esta operação pode ser utilizada para melhoria de processo.

6. CONCLUSÃO

A extração de flavonoides, compostos bioativos e Artepelin-C da própolis verde em solução etanólica por tecnologia de alta pressão isostática a 25 MPa por um minuto mostrou-se mais eficiente em comparação com os métodos tradicionais de processamento, como a maceração estática e com agitação (100 rpm), nas mesmas condições de temperatura (40 °C) e relação sólido: solvente (1:3 m/m), considerando o tempo necessário de processamento para extração. No processamento por alta pressão, o tempo de um minuto extraiu teor de flavonoides totais correspondente ao teor da extração por agitação entre 5 e 6 horas ou 5 e 6 dias de maceração estática, teor de compostos fenólicos correspondente a mais de 8 horas de extração por agitação ou 8 dias de maceração estática e teor de Artepelin-C correspondente a 4 horas de agitação ou 5 dias de maceração estática. No processamento por ultrassom (480 W/40minutos/40 °C/relação sólido: solvente 1:3 m/m) em 40 minutos foi extraído um teor de flavonoides totais maior que 9 horas de maceração por agitação e correspondente ao teor obtido entre 6 e 7 dias de maceração estática, teor de compostos fenólicos totais correspondente a mais de 8 horas de agitação ou 10 dias de maceração estática e teor de Artepelin-C correspondente a 4,5 horas de maceração por agitação ou 5,5 dias de forma estática. Comparando-se os extratos obtidos pelas novas tecnologias, utilizando os melhores parâmetros de extração por alta pressão (25 MPa/40 °C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 m/m) com os extratos obtidos com as melhores variáveis de extração assistida por ultrassom (480 W/40minutos/40 °C/relação sólido:solvente 1:3), foram obtidos valores próximos para compostos fenólicos totais (25,25 mg/mL e 25,52 mg/mL respectivamente), porém a extração assistida por ultrassom apresentou valores maiores para flavonoides (8% maior) e para Artepelin-C (16% maior).

7. REFERÊNCIAS

- ADAM, F.; ABERT-VIAN, M.; PELTIER, G.; CHEMAT, F. “Solvent-free” ultrasound assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457–465, 2012.
- AGA, H. ; SHIBUYA, T. ; SUGIMOTO, T. ; KURIMOTO, M. ; NAKAJIMA, S. Isolation and Identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. Tokyo, v.58, n.5, p. 945 – 946, 1994.
- ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P. C. Ultrasound- assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**, v. 82, p. 575-82, 2003
- ALENCAR, S. M. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, Brazil, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- AOI, W.; HOSOGI, S. ; NIISATO, N. ; YOKOYAMA, N. ; HAYATA, H. ; MIYASAKI, H. ; KUSUZAKI, K. ; FUKUDA, T. ; FUKUI, M. ; NAKAMURA, N. ; MARUNAKA, Y. Improvement of insulin resistance, blood pressure and intestinal pH in early developmental stage of insulin resistance in OLETF rats by intake of propolis extract. **Biochem. and Bioph. Research Communications**. Kyoto, v. 432, p. 650 – 653, 2013.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.
- AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.V.; GIORGIO, S. **Effects of Brazilian propolis in *Leishmania amazonensis***. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 102(2): 215-220, 2007.

- BANKOVA, V.S.; BOUDOROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN J.M.; FRETE, X. KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S.S.. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Z. Naturforsch., C. J. Biosci.**, Tuebingen, v. 54C, p. 401-405, 1999.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S.; Chemical Constituents of Brazilian Propolis and their activities. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 61, p. 896-900, 1998.
- BARRALES, F.M. **Extração de óleo de semente de maracujá (*Passiflora edulis* sp.) usando CO₂ supercrítico assistido por ultrassom.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 122 p. Campinas, 2015.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BISCAIA, D.; FERREIRA, S.R.S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, 17–23, 2009.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 132, de 29 de Maio de 2003. Institui a categoria de registro de medicamentos específicos, que doravante passa a ser registrada de acordo com Regulamento Técnico anexo a esta resolução.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa – IN nº 09, de 17 de Agosto de 2009. Dispõe sobre a relação de produtos permitidos para dispensação e comercialização em farmácias e drogarias.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real

Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 jan 2001. Seção 1, p. 18-23.

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br/> . Acesso em 20 de Julho de 2016.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v. 36, p. 347 – 363, 1998.

BURIOL, L. **Extratos etanólicos e oleosos de própolis: quantificação e atividade biológica**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Centro-Oeste. 87 p. Guarapuava, 2008.

CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L.; CRISTIANINI, M. Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p. 351-357, jul./dez., 2003.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia** 73: S1-6, 2002.

CARVALHO S.S. **Análise Fotoacústica da cinética de penetração do fármaco *Cordia verbenacea* dc. (ACHEFLAN) na pele humana (massagem versus fonoforese)**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. 59 p. São José dos Campos, 2010.

CATTORINI, P.E. Le api e ghuommi. **Fitoterapia**. v. 34, p. 85-93, 1963.

CHEFTEL, J.C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v. 1, n. 2/3, p. 75-90, 1995.

CHEMAT, F. et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, n.4, p.813-835, 2011.

CHEN, C.; LEE, Y.; CHANG, C.J.; LEE, M.; WEI, C. Hot-pressurized fluid extraction of flavonoids and phenolic acids from Brazilian propolis and their cytotoxic assay in

vitro. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 38, 191–196, 2007.

CHEN, F.; SUN, Y.; ZHAO, G.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J.; WANG, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**, 14, 767-778, 2007.

CLAVER, I.; HAIHUA, Z.; QIN, L.; ZHOU, K.; HUIMING, Z. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from Chinese malted sorghum using response surface methodology. **Pakistan Journal of Nutrition**. Faisalabad, Pakistan, v. 9, n. 4, p. 336-342, 2010.

CORRALES, M.; GARCIA, A.F.; BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. **Journal of Food Engineering**, v. 90, 415–421, 2009.

COSTA A.C., **Ensaio por ultrassom com as técnicas convencional A – Scan e Phased Array em juntas soldadas dissimilares de aços carbono e aço inoxidável austenítico**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 114p. Belo Horizonte, 2011.

CUNHA, I.B.S.; AWAYA, A.C.H.; CAETANO F.M.; SHIMIZU, M.T.; MARCUCCI, M.C.; DREZZA, T.F.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **J. Braz. Chem. Soc.**, Campinas, v.15, n.6, p. 964 – 967, 2004.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PACHECO, E., LIMA, I.B., ABREU, J.A. e PARK, Y.K. Própolis vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, v. 89, p. 2-15, 2006.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 435-441, 2008.

- DIEHL, L.C.P. **Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico**. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.
- DOLATOWSKI Z.J., STADNIK J., STASIAK D., 2007. Applications of ultrasound in food technology. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.** 6(3), 89-99.
- DONG J., LIU Y., LIANG Z., WANG W. Investigation on ultrasound assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 61-65, 2010.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA (EMBRAPA). Produção de Própolis. Dez, 2010. Disponível em:
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32166/1/ProducaoPropolis.pdf>> . Acesso em 05 de Outubro de 2016.
- FARKAS, D. F., & HOOVER, D. G. High pressure processing. **Journal of Food Science**, 65(4), 47–64, 2000.
- FAUZI, A.N.; FARID, M.M.; SILVA, F.V.M. **High-Pressure Processing of Manuka Honey: Improvement of Antioxidant Activity, Preservation of Colour and Flow Behaviour**. Food Bioprocess Technol. Julho, 2014.
- FELLOWS P.J., **Food processing technology: Principles and practice**. Woodhead Publishing. 2000.
- FERNANDES-SILVA, C.C.; SALATINO, A.; SALATINO, M.; BREYER, E.D.H.; NEGRI, G. Chemical profilong of six samples of Brazilian Propolis. **Química Nova**, v. 36, n.2, p. 237-240, 2013.
- GARCIA-SALAS, P., MORALES-SOTO A., SEGURA-CARRETERO A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. Phenolic-Compound-Extraction System for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, v.15, p. 8813-8826, 2010

- GHASEMI, E.; YAMINI, Y.; BAHRAMIFAR, N.; SEFIDKON, F. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia sieberi*. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 1, p. 306-311, 2007.
- GHASSEMPOUR, A.; HEYDARI, R.; TALEBPOUR, Z.; FAKHARI, A. R.; RASSOULI, A.; DAVIES, N.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Study of new extraction methods for separation of anthocyanins from red grape skins: Analysis by HPLC and LCMS/MS. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 31, 2686-2703, 2008.
- GHISALBERTI, V.Q. Propolis: a review. **Bee World**, Gerrads Cross, v.60, n.2, p. 59-84, 1979.
- GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E.M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia** 44: 230-232, 1988.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345 – 391, 2012.
- HAVSTEEN B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therapeutics**, 96, 67-202, 2002.
- HE, B.; ZHANG, L.; YUE, X.; LIANG, J.; JIANG, J.; GAO, X.; YUE, P. Optimization of Ultrasound-Assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**, 204, 70-76, 2016.
- HSU, K-C. Evaluation of processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, 41, 450-459, 2008.
- JAYASOORIYA S.D., BHANDARI B.R., TORLEY P., D'ARCY B.R., 2004. Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. **Int. J. Food Prop.** 7, 2, 301-319.

- JUN, X.; DEJI, S.; SHOU, Z.; BINGBING, L.; YE, L.; RUI, Z. Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, p. 139–143, 2009.
- IKEGAKI, M. **Determinação de qualidade de própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis**. Tese de doutorado. Departamento de Ciências dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2001.
- KACHA-ANANDA, S.; TRAGOOLPUA, K.; CHANTAWANNAKUL, P. TRAGOOLPUA, Y. Antioxidant and Anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Vol 14, 2013.
- KNORR, D. Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. **Food Technology** – Chicago 47, 156–161, 1993.
- KNORR, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V.; LEE, D. U. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 261-266, 2004.
- KOTHAI, S.; JAYANTHI, B. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee propolis (*Tetragonula iridipennis*) of Tamilnadu, India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. Vol 6, Issue 8, 2014.
- LAVINAS, F.C.; LOPES, M.L.M.; MESQUITA, V.L.V. efeito da alta pressão hidrostática sobre a inativação de microrganismos. B.CEPPA. v.25, n.1, p. 25-36, jan./jun. 2007.
- LI, H.; KAPUR, A.; YANG, J.X.; SRIVASTAVA, S.; McLEOD, D.G.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; DAUGSCH, A.; PARK, Y.K.; RHIM, J.S. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. **International Journal of Oncology** 31:601-606, 2007.

- LIMA, C.A.; OLIVEIRA, J.; PEDREIRA, A.J.L.A.; CASTIGLIONI, S.A.C. **Estudo da viabilidade financeira da implantação de um apiário para a produção de própolis e mel.** XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2006. Disponível em <http://www.sober.org.br/palestra/5/869.pdf>. Acesso em 15/04/2015.
- LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17(3): 388-395, Jul./Set. 2007
- LONGO G. J., **Ultrassom**. São Paulo: KLD. 2008.
- LOTFY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.7, p. 22-31, 2006.
- LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22(1), p. 41-7, 2003.
- MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Sastsuma mandarin (Citrus unshiu Marc.) peels. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 5682-90, 2008.
- MACHADO, M.T.C. **Processos integrados para extração, clarificação e concentração de açúcares prebióticos a partir de resíduos de alcachofra.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 207 p. 2015
- McINERNEY, J. K.; SECCAFIEN, C. A.; STEWART, C. M.; BIRD, A. R. Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 8, 543-548, 2007.
- MAGGI L.E.; OMENA, T.P.; VON KRÜGER, M.A.; PEREIRA, W.C.A. Software didático para modelagem padrão de aquecimento dos tecidos irradiados por ultrassom fisioterapêutico. **Rev. Bras. Fisioter.**, V.12, n° 3, p. 204-214. 2008.

- MALASPINA, O.; PALMA, M. S. **Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação. Congresso International de Propoleos. Argentina.** 2000. Disponível em: <<http://www.culturaapicola.com.ar>>. Acesso em: 14 de Maio de 2014.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, 19(5), p. 529-536, 1996.
- MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical composition of Brazilian própolis from São Paulo state.
- MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian própolis. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.2, p. 115-123, 1999.
- MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.L.; PASTORES, G.M.; PARK, Y.K. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(1): 178-181, jan.-mar. 2008
- MASON T.J., PANIWNKY L., LORIMER J.P.. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrason. Sonochem.** 3, S253-S260, 1996.
- MATSUDA, S.H. Propolis - health care food. **Foods and Foods Ingred.** Jap., 160, p. 64-73, 1994.
- MATSUDA, A.H. **Aplicação da Técnica de Irradiação Gama para Preservação de Própolis. Dissertação de Mestrado** - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade Estadual de São Paulo. 72p. São Paulo, SP, 2006.
- MATSUDA, A.H. **Caracterização e controle de qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil.** Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de São Paulo. 120p. São Paulo, SP, 2006.

- MATSUDA, A.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Validated Method for the Quantification of Artepillin-C in Brazilian Propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 19:179-183, 2008.
- MATSUNO, T.; JUNG, S.K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-Diprenyl-4-Hydroxycinnamic acid (Artepillin-C) isolated from propolis. **Anticancer Res.**, Attiki, v. 17, p. 3565-3568, 1997.
- MEIRELES, M.A.A. 2008. Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications, CRC Press, Boca Raton, Florida
- MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J.C.C.; HUBINGER, M.D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, 533–539, 2010.
- MELO, I.L.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. . Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2011;31(1):194-7
- MELO, I.L.P.; MATSUDA, A.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Identidade e Qualidade de Própolis provenientes de quatro regiões do Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.71, n.3, São Paulo, 2012
- MISHIMA, S.; YOSHIDA, C.; AKINO, S.; SAKAMOTO, T. Antihypertensive effects of Brazilian propolis: identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 28, 1909-14, 2005.
- MN PRÓPOLIS. Como a própolis é processada, 2016. Disponível em: <http://www.mnpropolis.com.br/produtos_propolis.asp>. Acesso em: 15 de junho de 2016.
- MORAES, C.S. **Estudo comparativo de diferentes extrações de própolis dos grupos 12 e 13 e suas atividades biológicas.** Dissertação de Mestrado.

Departamento de Ciência dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2007.

NANTASENAMAT, C.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; NAENNA, T.; PRA CHAYASITTIKUL, V. Prediction of bond dissociation enthalpy of antioxidant phenols by support vector machine. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 27, p.188- 196, 2008.

NYBORG L. W., Ultrasonic microstreaming and related phenomena. **Br. J. Cancer** 45, Supl. V, 156. USA. 1982.

PANIWNYK, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J. P.; MASON, T. J. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 299-301, 2001.

PAREDES-GUZMÁN, J.; AGUIAR, C.L.; FUJIWARA, F.; PARK, Y.K. Estudo das própolis que contem Artepillin C. **Mensagem Doce**, n. 74, p. 9-16, 2003.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; SATO, H.H.; CONTADO, J.L., Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1253-1259, 1995.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18(3): 313-318, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, Tamagawa, Japan, v. 21, p. 85-90, 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. **Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas.** Mensagem Doce, v. 58, 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm>>. Acesso: em 10 de Novembro de 2014.

- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J. Agric. Food Chem.**, California, USA, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.
- PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian própolis. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.
- PATEL M. V., DORIA A., TOVAR A. R., LEE A. P., Size based particle separation using acoustic streaming and alcat pumps. **16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences**. Okinawa, Japan. October 28 - November 1, 2012,
- PATRAS, A.; BRUNTON, N.P.; DA PIEVE, S.; BUTLER, F. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. Vol 10, Issue 3, 308-313, 2009.
- PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Química Nova** 25: 321-326, 2002.
- PIETTA, P.G., GARDANA, C.; PIETTA, A.M. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73(Suppl. 1), S7–S20.
- PRASAD, K.N.; YANG, B.; ZHAO, M.; RUENROENGLIN, N.; JIANG, Y. Application of Ultrasonication or High-Pressure Extraction of Flavonoids from Litchi Fruit Pericarp. **Journal of Food Process Engineering**, v. 32, 828–843, 2009.
- PRASAD, K.N.; YANG, E.; YI, C.; ZHAO, M.; JIANG, Y. **Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp**. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10 (2009) 155–159
- PRYTZYK E.; DANTAS, A.P.; SALOMAO, K. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **Journal Ethnopharmacol**, 88, 189-93, 2003.

- RABELO, R.S.; MACHADO, M.T.C.; MARTÍNEZ, J.; HUBINGER, M.P. Ultrasound assisted extraction and nanofiltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes. **Journal of Food Engineering**, 178, 170-180, 2016.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P. BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1995.
- SANTOS, C.R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, supl., p. 74-77, 2003.
- SCHELLER, S., KROL, W., SEDLACZEK, R., ZYDOWICZ, G., WOJCIK, L. E SHANI, J. Ethanolic extract of propolis (EEP), a natural antioxidant, prolongs life span of male and female mice. **Pharmacology**, v. 3, p. 123-125, 1994.
- SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**. v.133, p.253–260, 2011.
- SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of Artepillin-C in Brazilian propolis. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 424, n.2, p. 181-188, 2004.
- SHIMIZU, T.; HINO, A.; TSUTSUMI, A.; PARK, Y.K.; WATANABE, W.; KUORAKAWA, M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza in mice. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy** 19:7-13, 2008.
- SHOUQIN, Z.; JUNJIE, Z.; CHANGZENG, W. Novel high pressure extraction technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, 471–474, 2004.
- SHOUQIN, Z.; JUN, X.; CHANGZHENG, W. Z. Effect of High Hydrostatic Pressure on Extraction of Flavonoids in Propolis. **Food Science and Technology International**, v. 11: 213, 2005.

- SHOUQIN, Z.; RUIZHAN, C.; CHANGZHENG, W. Experiment study on ultrahigh pressure extraction of Ginsenosides. **Journal of Food Engineering**, v. 79, Issue 1, Pages 1–5, March 2007.
- SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science Technology**, 21, 323-331, 2010.
- SUZUKI, I. **A própolis de solução aquosa**. Mensagem Doce v. 58. 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 15 de Julho de 2014.
- TAO, Y.; SUN, D. Enhancement of food processes by ultrasound: a review. **Food Science and Nutrition**, v.55, n.4, p.570-594, 2015.
- TORRES, J.A.; VELAZQUEZ, G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. **Journal of Food Engineering**, v. 67, 95-112, 2005.
- TOSI, B; DONINI, A.; ROMAGNOLI, C.; BRUNI, A.; Antimicrobial Activity of Some Commercial Extracts of Propolis Prepared with Different Solvents. **Phytotherapy Research**, Italy, v.10, p.335-336, 1996.
- TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chem. Cent. Journal**, v. 1, 1-4, 2007.
- TYLKOWSKIA, B.; TRUSHEVAB, B.; BANKOVAB, V.; GIAMBERINIC, M.; PEEVA, G.; NIKOLOVAA, A. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 348, 124–130, 2010.
- VEGGI P. C. **Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 220 p. Campinas, SP, 2012.

- VIEIRA, V.B. **Obtenção do extrato de própolis assistida por micro-ondas, aplicação em linguiça Toscana e avaliação da sua capacidade antioxidante.** Dissertação de Mestrado. 78 p. Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2012.
- VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161-169, 2008.
- VINATORU M. An overview of the ultrasonically assisted extration of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.
- WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.
- WOISKY, R.G. do Rio. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 74 f. 1996.
- XI, J. Effect of high pressure processing on the extraction of lycopene in tomato paste waste. **Chemical Engineering & Technology**, 29, 736-739, 2006.
- XU, Y.; LUO, L.; CHEN, B.; FU, Y. Recent development of chemical components in propolis. **Frontiers of Biology in China**, v.4,no.4 ,p.385–391,2009.
- YANG, B.; JIANG, Y.; WANG, R.; ZHAO, M.; SUN, J. Ultra-high pressure treatment effects on polysaccharides and lignins of longan fruit pericarp. **Food Chem.** v. 112, p. 428–431, 2009.
- YEO, K.L.; LEO, C.P.; CHAN, D.J.C.C. Ultrasonic enhancement on propolis extraction at varied pH and alcohol content. **Journal of Food Process Engineering** 38, 562–570, 2015.

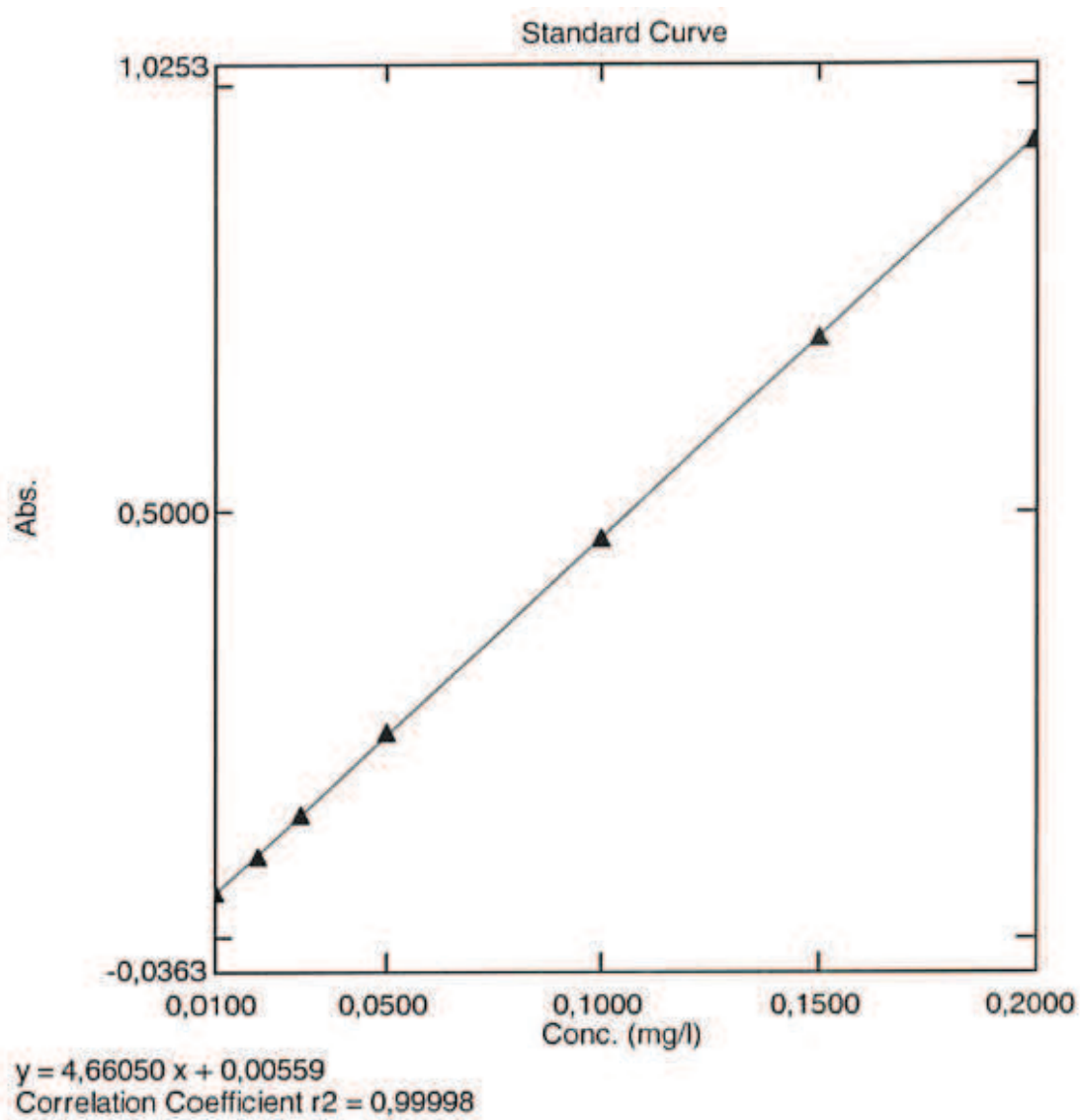
ANEXOS**ANEXO A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO**

Figura 24: Curva de Calibração para Flavonoides Totais

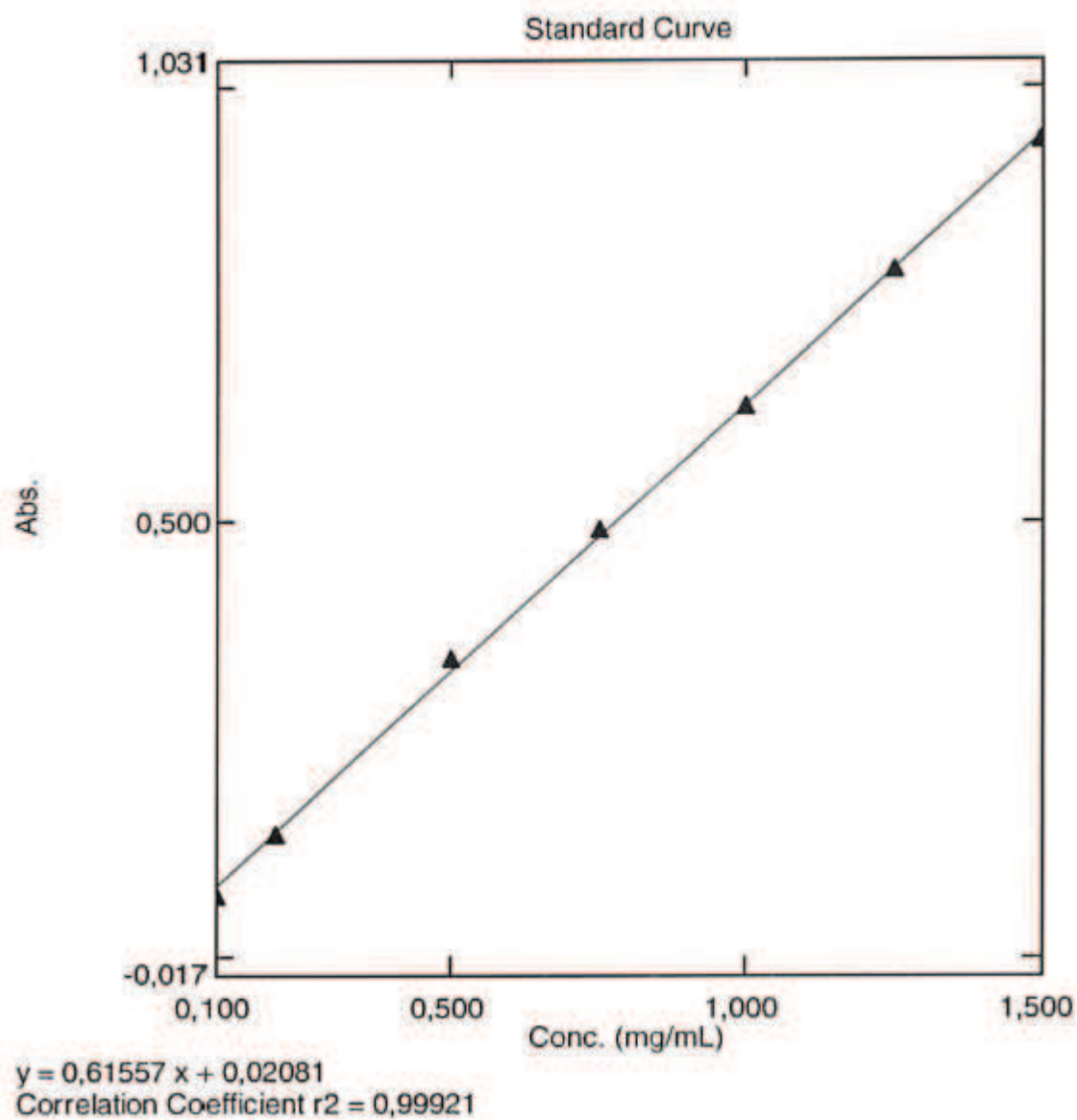


Figura 25: Curva de Calibração – Compostos Fenólicos Totais

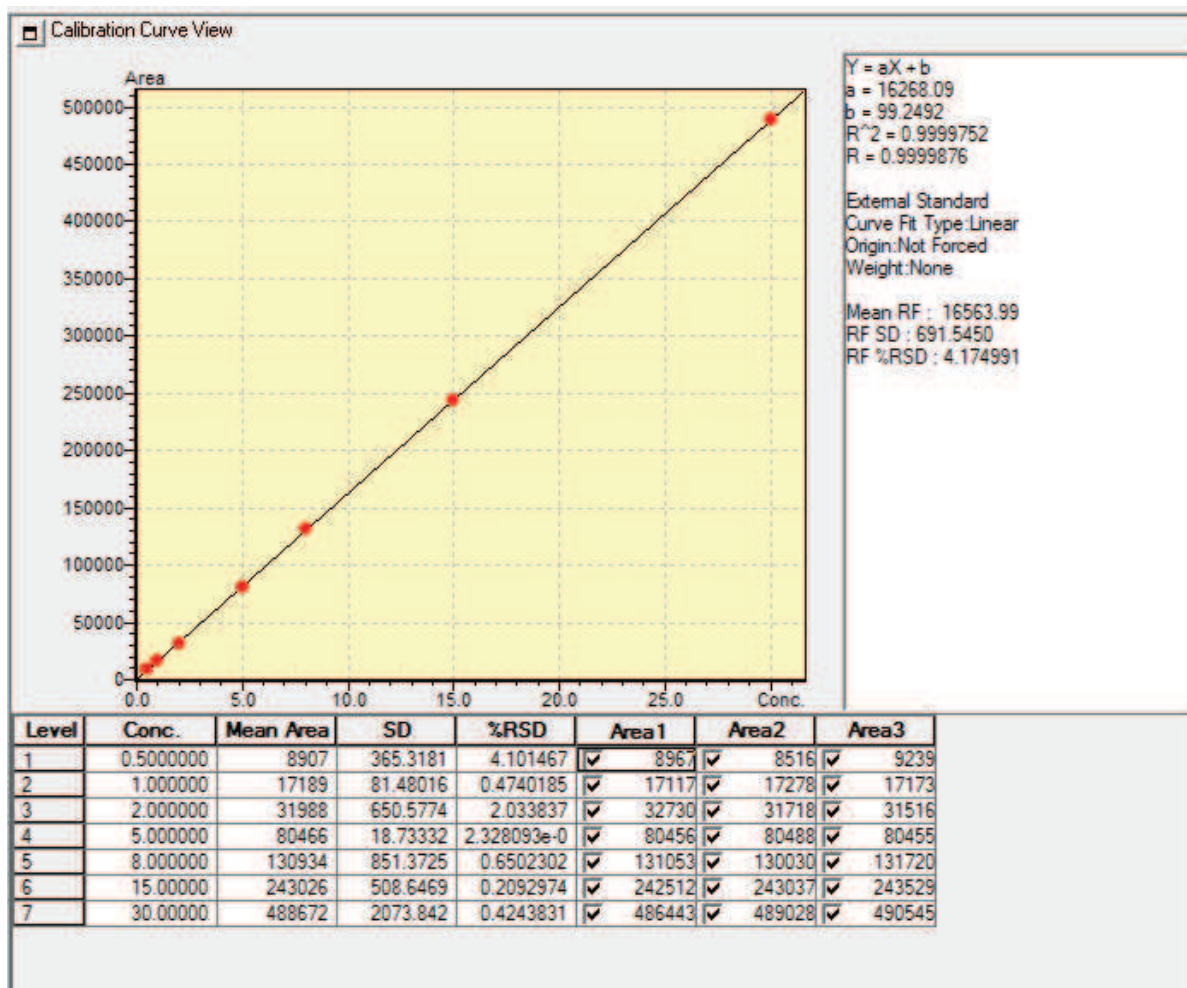


Figura 26: Curva de Calibração – Artepellin-C

ANEXO B: Tabelas para Compostos Bioativos dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m).

Tabela 5: Flavonoides Totais extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m).

Tecnologia	Variável	Flavonoides Totais (mg/mL)
Alta Pressão (MPa)	25	12,83 ^{aA} ± 0,07
	50	12,79 ^{aA} ± 0,09
	100	12,76 ^{aA} ± 0,05
	200	12,78 ^{aA} ± 0,03
	300	12,75 ^{aA} ± 0,04
	400	12,75 ^{aA} ± 0,03
	500	12,74 ^{aA} ± 0,02
	600	12,83 ^{aA} ± 0,05
Maceração Estática (dias)	1	0,96 ^{bB} ± 0,02
	2	3,25 ^{cC} ± 0,03
	3	5,22 ^{dD} ± 0,18
	4	8,36 ^{eE} ± 0,02
	5	10,83 ^{fF} ± 0,02
	6	12,75 ^{gA} ± 0,02
	7	14,86 ^{hG} ± 0,02
	8	16,42 ^{iH} ± 0,02
	9	16,46 ^{iH} ± 0,02
	10	16,47 ^{iH} ± 0,02
Maceração com Agitação (horas)	1	4,33 ^{jI} ± 0,02
	2	7,12 ^{kJ} ± 0,00
	3	10,22 ^{lK} ± 0,02
	4	11,44 ^{mL} ± 0,01
	5	13,60 ^{nM} ± 0,17
	6	15,69 ^{oN} ± 0,01
	7	15,70 ^{oN} ± 0,01
	8	15,76 ^{oN} ± 0,00
	9	15,75 ^{oN} ± 0,00

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

Tabela 6: Compostos Fenólicos Totais dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m).

Tecnologia	Variável	Compostos Fenólicos Totais (mg/mL)
Alta Pressão (MPa)	25	33,40 ^{aA} ± 0,41
	50	33,45 ^{aA} ± 0,19
	100	33,43 ^{aA} ± 0,53
	200	33,53 ^{aA} ± 0,25
	300	33,38 ^{aA} ± 0,18
	400	33,38 ^{aA} ± 0,22
	500	33,43 ^{aA} ± 0,25
	600	33,50 ^{aA} ± 0,12
Maceração Estática (dias)	1	2,80 ^{bB} ± 0,04
	2	8,75 ^{cC} ± 0,01
	3	12,46 ^{dD} ± 0,01
	4	18,32 ^{eE} ± 0,01
	5	24,33 ^{fF} ± 0,13
	6	29,50 ^{gG} ± 0,04
	7	35,86 ^{hH} ± 0,01
	8	37,18 ^{iI} ± 0,05
	9	37,42 ^{iH} ± 0,04
	10	37,49 ^{iK} ± 0,04
Maceração com Agitação (horas)	1	10,94 ^{jL} ± 0,01
	2	16,13 ^{kM} ± 0,00
	3	23,27 ^{lN} ± 0,01
	4	26,11 ^{mO} ± 0,01
	5	30,24 ^{nP} ± 0,01
	6	34,83 ^{oQ} ± 0,00
	7	36,33 ^{pR} ± 0,01
	8	36,34 ^{pS} ± 0,01

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

Tabela 7: Artepellin-C (%) dos extratos obtidos por processamento por alta pressão isostática em diferentes pressões por um minuto, maceração estática por dias e maceração por agitação em horas, a 40 °C e relação sólido:solvente 1:2 (m/m).

Tecnologia	Variável	Artepellin-C (%)
Alta Pressão (MPa)	25	1,54 ^{aA} ± 0,01
	50	1,54 ^{aA} ± 0,02
	100	1,54 ^{aA} ± 0,01
	200	1,54 ^{aA} ± 0,02
	300	1,54 ^{aA} ± 0,01
	400	1,53 ^{aA} ± 0,01
	500	1,53 ^{aA} ± 0,01
	600	1,54 ^{aA} ± 0,01
	1	0,05 ^{bB} ± 0,00
Maceração Estática (dias)	2	0,27 ^{cC} ± 0,01
	3	1,02 ^{dD} ± 0,02
	4	1,42 ^{eE} ± 0,01
	5	1,55 ^{fA} ± 0,01
	6	2,05 ^{gF} ± 0,02
	7	2,35 ^{hG} ± 0,01
	8	2,42 ^{iH} ± 0,01
	9	2,58 ^{jI} ± 0,01
	10	2,59 ^{jJ} ± 0,01
	1	0,98 ^{kK} ± 0,00
Maceração com Agitação (horas)	2	1,21 ^{lL} ± 0,00
	3	1,52 ^{mA} ± 0,01
	4	1,83 ^{nM} ± 0,00
	5	2,23 ^{oN} ± 0,01
	6	2,53 ^{pO} ± 0,04
	7	2,86 ^{qP} ± 0,00
	8	3,51 ^{rQ} ± 0,01
	9	4,73 ^{sR} ± 0,01

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

ANEXO C – Compostos bioativos dos extratos obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tabela 8: Flavonoides Totais (mg/mL) dos extratos obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Flavonoides Totais (mg/mL)
Alta Pressão (MPa)	25	10,05 ^{aA} ± 0,13
	50	10,02 ^{aA} ± 0,06
	100	10,02 ^{aA} ± 0,07
	200	10,02 ^{aA} ± 0,05
	300	10,03 ^{aA} ± 0,06
	400	10,04 ^{aA} ± 0,06
	500	10,02 ^{aA} ± 0,04
	600	10,01 ^{aA} ± 0,03
Maceração Estática (dias)	1	0,70 ^{bB} ± 0,02
	2	2,43 ^{cC} ± 0,05
	3	3,60 ^{dD} ± 0,02
	4	6,31 ^{eE} ± 0,02
	5	8,42 ^{fF} ± 0,03
	6	10,61 ^{gG} ± 0,02
	7	11,10 ^{hH} ± 0,12
	8	11,08 ^{hI} ± 0,11
	9	11,11 ^{hJ} ± 0,08
	10	11,11 ^{hK} ± 0,08
Maceração com Agitação (horas)	1	3,18 ^{iL} ± 0,05
	2	4,70 ^{jM} ± 0,04
	3	3,60 ^{kN} ± 0,05
	4	7,60 ^{lO} ± 0,04
	5	9,15 ^{mP} ± 0,07
	6	10,42 ^{nQ} ± 0,08
	7	10,48 ^{nG} ± 0,05
	8	10,49 ^{nG} ± 0,03
	9	10,49 ^{nG} ± 0,03

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

Tabela 9: Compostos Fenólicos Totais (mg/mL) dos extratos obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Compostos Fenólicos (mg/mL)
Alta Pressão (MPa)	25	25,25 ^{aA} ± 0,26
	50	25,28 ^{aA} ± 0,10
	100	25,23 ^{aB} ± 0,08
	200	25,28 ^{aA} ± 0,13
	300	25,26 ^{aA} ± 0,13
	400	25,29 ^{aA} ± 0,08
	500	25,22 ^{aA} ± 0,07
	600	25,25 ^{aA} ± 0,10
Maceração Estática (dias)	1	1,85 ^{bD} ± 0,07
	2	6,09 ^{cE} ± 0,14
	3	9,61 ^{dF} ± 0,05
	4	16,14 ^{eG} ± 0,11
	5	20,05 ^{fH} ± 0,11
	6	24,28 ^{gI} ± 0,15
	7	24,60 ^{hJ} ± 0,09
	8	25,32 ^{iA} ± 0,07
	9	25,43 ^{iC} ± 0,05
	10	25,42 ^{iA} ± 0,08
Maceração com Agitação (horas)	1	7,28 ^{jK} ± 0,08
	2	10,80 ^{kL} ± 0,02
	3	9,61 ^{lM} ± 0,03
	4	17,30 ^{mN} ± 0,02
	5	20,92 ^{nO} ± 0,01
	6	23,21 ^{oP} ± 0,03
	7	24,12 ^{pI} ± 0,06
	8	24,61 ^{qJ} ± 0,02

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

Tabela 10: Artepelin-C dos extratos obtidos por processamento em alta pressão a 40°C/1 minuto/relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Artepelin-C (%)
Alta Pressão (MPa)	25	1,12 ^{a A} ± 0,05
	50	1,12 ^{a A} ± 0,06
	100	1,11 ^{a AB} ± 0,06
	200	1,13 ^{a A} ± 0,04
	300	1,12 ^{a A} ± 0,05
	400	1,12 ^{a A} ± 0,04
	500	1,12 ^{a A} ± 0,04
	600	1,13 ^{a A} ± 0,04
Maceração Estática (dias)	1	0,00 ^{b G} ± 0,00
	2	0,20 ^{c H} ± 0,01
	3	0,70 ^{d I} ± 0,02
	4	1,01 ^{e C} ± 0,09
	5	1,19 ^{f A} ± 0,06
	6	1,43 ^{g D} ± 0,02
	7	1,53 ^{h E} ± 0,03
	8	1,64 ^{i F} ± 0,02
	9	1,72 ^{i F} ± 0,02
	10	1,72 ^{i F} ± 0,02
Maceração com Agitação (horas)	1	0,61 ^{j J} ± 0,03
	2	0,81 ^{k K} ± 0,01
	3	0,70 ^{l BC} ± 0,05
	4	1,20 ^{m A} ± 0,02
	5	1,50 ^{n DE} ± 0,02
	6	1,70 ^{o F} ± 0,02
	7	1,89 ^{p L} ± 0,04
	8	2,09 ^{q M} ± 0,07
	9	2,10 ^{q N} ± 0,06

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

ANEXO D: Compostos Bioativos dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tabela 11: Flavonoides Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Flavonoides Totais (mg/mL)
Ultrassom (W)	160	9,84 ^{a C} ± 0,02
	320	10,40 ^{b A} ± 0,03
	480	10,73 ^{c D} ± 0,03
	640	10,74 ^{c E} ± 0,02
	792	10,75 ^{c F} ± 0,02
Maceração Estática (dias)	1	0,70 ^{d G} ± 0,02
	2	2,43 ^{e H} ± 0,05
	3	3,60 ^{f I} ± 0,02
	4	6,31 ^{g J} ± 0,02
	5	8,42 ^{h K} ± 0,03
	6	10,61 ^{i B} ± 0,02
	7	11,10 ^{j L} ± 0,12
	8	11,08 ^{j M} ± 0,11
	9	11,11 ^{j N} ± 0,08
	10	11,11 ^{j O} ± 0,08
Maceração com Agitação (horas)	1	3,18 ^{k P} ± 0,05
	2	4,70 ^{l Q} ± 0,04
	3	3,60 ^{m R} ± 0,05
	4	7,60 ^{n S} ± 0,04
	5	9,15 ^{o T} ± 0,07
	6	10,42 ^{p A} ± 0,08
	7	10,48 ^{p A} ± 0,05
	8	10,49 ^{p A} ± 0,03
	9	10,49 ^{p AB} ± 0,03

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

Tabela 12: Compostos Fenólicos Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Compostos Fenólicos (mg/mL)
Ultrassom (W)	160	13,45 ^{aD} ± 0,05
	320	17,62 ^{bE} ± 0,03
	480	23,01 ^{cF} ± 0,15
	640	23,06 ^{cA} ± 0,06
	792	23,05 ^{cA} ± 0,07
Maceração Estática (dias)	1	1,85 ^{dG} ± 0,07
	2	6,09 ^{eH} ± 0,14
	3	9,61 ^{fI} ± 0,05
	4	16,14 ^{gJ} ± 0,11
	5	20,05 ^{hK} ± 0,11
	6	24,28 ^{iB} ± 0,15
	7	24,60 ^{jC} ± 0,09
	8	25,32 ^{kL} ± 0,07
	9	25,43 ^{kM} ± 0,05
	10	25,42 ^{kN} ± 0,08
Maceração com Agitação (horas)	1	7,28 ^{lO} ± 0,08
	2	10,80 ^{mP} ± 0,02
	3	9,61 ^{nQ} ± 0,03
	4	17,30 ^{oR} ± 0,02
	5	20,92 ^{pS} ± 0,01
	6	23,21 ^{qA} ± 0,03
	7	24,12 ^{rB} ± 0,06
	8	24,61 ^{sC} ± 0,02

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

Tabela 13: Artepelin-C (%) dos extratos obtidos variando-se a potência do ultrassom, em temperatura de 40 °C, relação sólido:solvente de 1:3 (m/m) e tempo de 20 minutos, maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Artepelin-C (%)
Ultrassom (W)	160	1,15 ^{a A} ± 0,03
	320	1,23 ^{b A} ± 0,02
	480	1,34 ^{c G} ± 0,02
	640	1,33 ^{c H} ± 0,02
	792	1,34 ^{c I} ± 0,03
Maceração Estática (dias)	1	0,00 ^{d J} ± 0,00
	2	0,20 ^{e K} ± 0,01
	3	0,70 ^{f L} ± 0,02
	4	1,01 ^{g B} ± 0,09
	5	1,19 ^{h A} ± 0,06
	6	1,43 ^{i C} ± 0,02
	7	1,53 ^{j D} ± 0,03
	8	1,64 ^{k E} ± 0,02
	9	1,72 ^{k F} ± 0,02
	10	1,72 ^{k F} ± 0,02
Maceração com Agitação (horas)	1	0,61 ^{l M} ± 0,03
	2	0,81 ^{m N} ± 0,01
	3	0,70 ^{n B} ± 0,05
	4	1,20 ^{o A} ± 0,02
	5	1,50 ^{p CD} ± 0,02
	6	1,70 ^{q EF} ± 0,02
	7	1,89 ^{r O} ± 0,04
	8	2,09 ^{s P} ± 0,07
	9	2,10 ^{s Q} ± 0,06

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

ANEXO E: Compostos Bioativos dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tabela 14: Flavonoides Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Flavonoides Totais (mg/mL)
Ultrassom	10	10,25 ^{a B} ± 0,04
	20	10,73 ^{b C} ± 0,03
	40	10,88 ^{c D} ± 0,03
	60	10,87 ^{c E} ± 0,02
Maceração Estática	1	0,70 ^{d F} ± 0,02
	2	2,43 ^{e G} ± 0,05
	3	3,60 ^{f H} ± 0,02
	4	6,31 ^{g I} ± 0,02
	5	8,42 ^{h J} ± 0,03
	6	10,61 ^{i A} ± 0,02
	7	11,10 ^{j K} ± 0,12
	8	11,08 ^{j L} ± 0,11
	9	11,11 ^{j M} ± 0,08
	10	11,11 ^{j N} ± 0,08
Maceração com Agitação	1	3,18 ^{k O} ± 0,05
	2	4,70 ^{l P} ± 0,04
	3	3,60 ^{m Q} ± 0,05
	4	7,60 ^{n R} ± 0,04
	5	9,15 ^{o S} ± 0,07
	6	10,42 ^{p T} ± 0,08
	7	10,48 ^{p U} ± 0,05
	8	10,49 ^{p A} ± 0,03
	9	10,49 ^{p A} ± 0,03

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

Tabela 15: Compostos Fenólicos Totais (mg/mL) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Compostos Fenólicos
Ultrassom (min)	10	18,80 ^{a D} ± 0,04
	20	23,01 ^{b E} ± 0,15
	40	25,52 ^{c A} ± 0,06
	60	25,55 ^{c A} ± 0,04
Maceração Estática (dias)	1	1,85 ^{d F} ± 0,07
	2	6,09 ^{e G} ± 0,14
	3	9,61 ^{f H} ± 0,05
	4	16,14 ^{g I} ± 0,11
	5	20,05 ^{h J} ± 0,11
	6	24,28 ^{i B} ± 0,15
	7	24,60 ^{j C} ± 0,09
	8	25,32 ^{k K} ± 0,07
	9	25,43 ^{k A} ± 0,05
	10	25,42 ^{k A} ± 0,08
Maceração com Agitação (horas)	1	7,28 ^{l L} ± 0,08
	2	10,80 ^{m M} ± 0,02
	3	9,61 ^{n N} ± 0,03
	4	17,30 ^{o O} ± 0,02
	5	20,92 ^{p P} ± 0,01
	6	23,21 ^{q Q} ± 0,03
	7	24,12 ^{r B} ± 0,06
	8	24,61 ^{s C} ± 0,02

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.

Tabela 16: Artepellin-C (%) dos extratos obtidos variando-se o tempo em ultrassom a 480 W, 40 °C e relação sólido:solvente 1:3 (m/m), maceração estática a 40 °C/relação sólido:solvente 1:3 m/m e maceração com agitação a 100 rpm/40 °C/relação sólido:solvente 1:3 (m/m)

Tecnologia	Variável	Artepellin-C (%)
Ultrassom (min)	10	1,02 ^{a A} ± 0,01
	20	1,14 ^{b B} ± 0,02
	40	1,30 ^{c F} ± 0,01
	60	1,32 ^{c G} ± 0,01
Maceração Estática (dias)	1	0,00 ^{d H} ± 0,00
	2	0,20 ^{e I} ± 0,01
	3	0,70 ^{f J} ± 0,02
	4	1,01 ^{g A} ± 0,09
	5	1,19 ^{h B} ± 0,06
	6	1,43 ^{i C} ± 0,02
	7	1,53 ^{j D} ± 0,03
	8	1,64 ^{k E} ± 0,02
	9	1,72 ^{k E} ± 0,02
	10	1,72 ^{k E} ± 0,02
Maceração com Agitação (horas)	1	0,61 ^{l K} ± 0,03
	2	0,81 ^{m L} ± 0,01
	3	0,70 ^{n A} ± 0,05
	4	1,20 ^{o B} ± 0,02
	5	1,50 ^{p CD} ± 0,02
	6	1,70 ^{q E} ± 0,02
	7	1,89 ^{r M} ± 0,04
	8	2,09 ^{s N} ± 0,07
	9	2,10 ^{s O} ± 0,06

Letras minúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos na mesma tecnologia.

Letras maiúsculas iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre diferentes amostras submetidas aos processamentos em tecnologias diferentes.